

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1933-1934. — N° 92

L'histospectrographie

Étude de ses techniques

Travail de l'Institut d'Histologie de la Faculté de Médecine de Lyon

THÈSE

Présentée

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 22 Décembre 1933

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Maurice PÉTEY

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE

MONITEUR D'HISTOLOGIE

Né le 18 août 1908, à Belfort.



IMPRIMERIE DE TRÉVOUX

G. PATISSIER

—
1933

L'HISTOSPECTROGRAPHIE

(ÉTUDE DE SES TECHNIQUES)

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR POLICARD

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1933-1934. — N° 92

L'histospectrographie

Étude de ses techniques

Travail de l'Institut d'Histologie de la Faculté de Médecine de Lyon

THÈSE

Présentée

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 22 Décembre 1933

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Maurice PÉTEY

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE

MONITEUR D'HISTOLOGIE

Né le 18 août 1908, à Belfort.



IMPRIMERIE DE TRÉVOUX

G. PATISSIER

1933

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire ...	M. L. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE
Assesseur	M. A. MOREL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CAZENEUVE, ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENQ, ROCHET,
BARRAL, ROLLET, DOYON

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. PIC
Cliniques chirurgicales	PAVIOT
Clinique obstétricale et Accouchements	FIXIER
Clinique ophtalmologique	BERARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	VORON
Clinique neurologique et psychiatrique	BONNET
Clinique des maladies des enfants	NICOLAS
Clinique des maladies des femmes	LEPINE (J.)
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURIQUAND
Clinique des maladies des voies urinaires	VILLARD
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie	COLLET
Clinique et prophylaxie de la tuberculose	GAYET
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie	NOVE-JOSSERAND
Chimie biologique et médicale	COURMONT
Chimie organique et Toxicologie	CLUZET
Matière médicale et Botanique	FLORENCE
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	MOREL
Anatomie	MANCEAU
Histologie	GUIART
Physiologie	LATARJET
Pathologie externe	POLICARD
Pathologie interne	HERMANN
Pathologie et Thérapeutique générales	LERICHE
Anatomie pathologique	FROMENT
Chirurgie opératoire	CADE
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie ..	FAVRE
Médecine légale	PATEL
Hygiène	ARLOING (F.)
Thérapeutique	ETIENNE MARTIN
Pharmacie et Pharmacologie	ROCHAIX
Hydrologie thérapeutique et climatologie	SAVY
	LEULIER
	PIERY

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Propédeutique de gynécologie	MM. CONDAMIN
Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale	THEVENOT (Léon)
Chargé d'un cours d'Embryologie	NOEL

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Chirurgie expérimentale	MM. TAVERNIER
Stomatologie	PONT

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
MAZEL	WERTHEIMER	EPARVIER	CREYSEL
DUMAS	GATE	GUILLEMINET	DE ROUGEMONT
DUFOUT	DECHAUME	MORENAS	PAUPERT-RAVAULT
DEVIC	BERNHEIM	REBATTU	PIGEAUD
GABRIELLE	POLLOSSON	REVOL	PONTHUS
MARTIN (Joseph)	CHAMBON	ENSELME	MALMEJAC
ROCHET (Ph.)	CIBERT	SEDALLIAN	

Examineurs de la Thèse :

M. POLICARD, *Président*,
MM. MOREL, NOËL, REVOL, *Assesseurs*.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



On appelle « *histospectrographie* » ou « *méthode histospectrographique* », un procédé d'analyse chimique des coupes histologiques, consistant à faire jaillir une étincelle électrique, en un point préalablement repéré d'une coupe, à prendre un spectre de raies (spectre d'émission) de cette étincelle, et à rechercher, dans le spectrogramme obtenu, les raies caractéristiques des divers éléments.

Les résultats donnés par la spectrographie sont trop connus et depuis trop longtemps pour qu'il soit besoin d'insister ici sur la sûreté et la richesse de cette méthode. « Science exclusivement expérimentale, disait G. Urbain, elle poursuit un but pratique ; mais elle est attrayante par la variété et l'élégance de ses méthodes ; elle est précieuse par la netteté des réponses qu'elle donne aux questions qu'on lui pose ».

L'histospectrographie est une de ces méthodes. De l'analyse spectrale, elle possède la simplicité, l'objectivité, la sensibilité. Mais elle en diffère par le fait qu'elle implique une localisation topographique sur un territoire histologique. Pour franchir cette étape, elle a dû devenir une technique vraiment nouvelle. Car si l'astronome

doit enregistrer durant toute une nuit le spectre d'une étoile lointaine, si le chimiste peut durant des heures, recommencer les pesées les plus ténues, l'histologiste, avec le spectrographe, est aux prises tout ensemble avec l'espace, la quantité, le temps. Ici, l'observation spectrale n'est plus un but, mais un moyen ; les quantités de matières à consommer sont microscopiques, ponctuellement et spatialement, et les recherches ne peuvent être recommencées.

Comme le principal avantage de cette méthode est précisément la localisation spatiale qu'elle permet, elle serait sans intérêt réel, si elle ne devenait une technique courante de biologie générale. Jusqu'ici, elle n'a donné ses résultats qu'entre les mains d'un petit nombre d'auteurs : ceux qui l'ont créée. Or, elle porte en elle une qualité aussi précieuse que sa sécurité et sa précision : c'est sa simplicité. Par cette simplicité, elle est destinée à un large emploi ; elle doit s'étendre hors des laboratoires puissamment outillés de quelques physiciens ou chimistes ; elle n'est plus une méthode d'exception, elle est devenue une technique courante.

Les résultats qu'elle a déjà donnés, ont été exposés maintes fois ; le présent travail, a donc pour objet d'exposer cette méthode d'une façon aussi simple que possible, de la vulgariser, si l'on peut dire. Cet exposé s'adresse donc non à des physiciens ou des chimistes, moins encore à des spécialistes de la spectrographie, mais à tous les biologistes et à tous les médecins.

Les points suivants seront successivement envisagés :

1° — Histoire de la spectrographie d'émission appliquée à la biologie.

2° — Technique employée.

3° — Autres techniques analogues.

4° — Etude des spectrogrammes. Données qualitatives.

5° — Données quantitatives.

6° — Avenir de cette méthode.

7° — Bibliographie.

Histoire de la spectrographie d'émission appliquée à la biologie.

L'histospectrographie est une méthode toute jeune. En effet, c'est depuis peu d'années que la spectrographie d'émission a été appliquée à la détection des éléments minéraux dans les recherches biologiques ; et l'histologie spectrographique, proprement dite, est née à la suite de ces premières recherches.

Parmi les travaux poursuivis dans cette direction, suivant les techniques employées, on doit distinguer deux directions principales.

1° Durant les premières années, l'analyse porte sur des fragments d'organes, sur des liquides organiques, des produits du métabolisme corporel, ou sur des cendres de tissus, sans considération topographique, ni

arrière-pensée histologique. Il s'agit là, non d'histochemie, mais tout au plus de « microchimie », au sens propre du terme, c'est-à-dire de « chimie des petites quantités ».

2° Dans une seconde catégorie de travaux, l'analyse porte sur des coupes, en des points précis et repérés des organes et des tissus. Elle implique une localisation, sinon cytologique (ceci est du domaine de l'avenir), mais tout au moins histologique. Il s'agit cette fois de l'histospectrographie proprement dite.

A la vérité, la spectrographie histologique est venue à son heure et paraît bien être le résultat des progrès faits par la spectrographie générale. Elle est la conséquence de l'introduction en technique spectrale, de l'étincelle de haute fréquence ; tandis que l'idée d'une spectranalyse simplement « organique » correspond plutôt à des modes de destruction moléculaire plus anciens, tels que l'arc, l'étincelle, et la flamme.

1° Méthodes spectrographiques du type microchimique.

Historique général.

Parmi les recherches récentes exécutées dans ce domaine, les principales sont les suivantes.

En 1925, *Bayle, Fabre et George*, utilisent des électrodes de charbon mouillées d'une pâte faite d'huile et

de la substance à étudier, et entre lesquelles jaillit une étincelle. Ils caractérisent ainsi, par leur spectre d'émission : *Ca*, dans le sang et dans les urines ; *Hg*, dans plusieurs produits organiques, à l'occasion de cas d'intoxication mercurielle ; *Bi*, au cours du traitement antisypilitique. La méthode des charbons creusés, et remplis de la matière à analyser, est employée également, plus tard, pour la recherche des traces métalliques abandonnées sur les lèvres d'une plaie par un projectile d'arme à feu.

En 1929, *Kahlenberg* et *Closs*, toujours par l'analyse spectrale, essayent de caractériser l'Aluminium au sein des tumeurs. *Mac Collum* et *Rasts* contredisent leurs résultats avec la même méthode — ce qui ne lui enlève rien de son intérêt.

En 1930, *Dutoit* et *Zbinden*, emploient les spectres d'arc pour analyser les cendres d'une grande quantité d'organes humains, qu'ils déclarent « normaux à l'autopsie ». Ils y décèlent *Ag*, *Al*, *Co*, *Ci*, *Cu*, *Li*, *Pb*, *Sn*, *Ti*, et *Au*.

En 1931, *Mouriquand*, *Leulier*, et *Nogier*, caractérisent spectrographiquement le Strontium, dans les épiphyyses osseuses de rats rachitiques, soumis à un régime contenant ce métal.

La même année, *S. Okajima*, au moyen d'électrodes en aluminium, recherche des métaux lourds dans les tissus normaux ou non de l'homme, et dans les organes d'animaux qui en ont reçu par la bouche, ou parentérament.

A côté de ces divers travaux, une série d'auteurs, d'après *Ramage*, emploient une autre technique simple

et élégante. Au lieu d'être détruite par un arc ou une étincelle électrique, la substance l'est par la flamme d'un Bunsen, alimenté au gaz d'éclairage ou à l'oxygène. Dans divers mémoires, parus de 1897 à 1901, sir *W. N. Hartley*, et *Hugh Ramage*, avaient préconisé la technique suivante. Une petite quantité (0,5 gr. environ) d'une substance quelconque à étudier, était enroulée dans du papier filtre sans cendre, en une sorte de petit paquet allongé. Ce petit paquet était brûlé dans la flamme du Bunsen en face de la fente d'un spectrographe en quartz. C'était du reste une méthode très proche de celle employée par *Bunsen* lui-même, l'un des pères de l'analyse spectrale.

En 1929, *H. Ramage*, applique cette technique à l'étude des divers tissus animaux ou végétaux ; il part d'un demi gramme de substance fraîche, la dessèche, la pulvérise, et les quelque 5 ctg. de poudre sont brûlés dans le Bunsen, comme précédemment.

En 1930, *H. M. Fox*, et *H. Ramage*, décèlent *Ag*, *Ca*, *Co*, *Cu*, *Fe*, *Li*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *Sr*, etc... dans des organes d'invertébrés. Ils établissent des solutions étalonnées des éléments en quantités croissantes et connues, et tentent une détermination pondérale de ces éléments. La comparaison de l'intensité des raies, espéraient-ils, permettrait des déductions quantitatives.

En 1931, *H. Ramage* et *J. H. Sheldon* découvrent le *Ba* dans la choroïde de l'œil du bœuf. Enfin, dans un vaste travail d'ensemble, *J. H. Sheldon* et *H. Ramage* rassemblent les nombreux résultats obtenus par cette méthode.

Ils décèlent une quantité d'éléments qu'ils tâchent d'apprécier quantitativement, dans le foie, la vésicule, la bile, le pancréas, la rate, le rein, la vessie, le poumon, etc... bref, dans la plupart des organes.

Critique de ces méthodes.

En dehors de toute considération topographique, le point faible de ces différentes méthodes, telles qu'elles ont été appliquées, réside précisément dans le mode de destruction qui les caractérise.

Il est certain que la flamme du Bunsen, en comparaison de l'étincelle de haute fréquence, apparaît comme un moyen beaucoup trop faible pour libérer les minéraux ; en outre, dans un autre ordre d'idées, cette vaste flamme activée par un courant d'oxygène est un véritable réceptacle pour les poussières qui flottent dans l'air ; et les raies parasites, issues de celles-ci, acquièrent dans la flamme une particulière vigueur.

Ainsi que le remarque Gerlach, avant la mise en œuvre de la haute fréquence, on ne possédait que l'arc ou l'étincelle à charbon pour vaporiser des substances non conductrices. « La sensibilité indubitable de cette méthode, dit-il, était maintes fois, par là même, rendue illusoire, parce que les charbons, avec leurs impuretés, forment une perpétuelle source d'erreurs (eine ewige Fehlerquelle), ou parce que les principales raies se trouvaient dans d'épaisses bandes ». La présence des bandes vient assombrir dans de plus grandes proportions encore les spectres d'étincelles (type Demarçay,

Lecoq de Boisbaudran, etc...) à tel point que pour des recherches biologiques, ce type de destruction tissulaire a dû être abandonné complètement.

2° Méthodes spectrographiques du type histochimique.

Toutes les erreurs provenant des techniques précédentes sont évitées par l'emploi de l'étincelle de haute fréquence, qui, tout en étant aussi énergique que l'étincelle condensée, se rapproche de l'étincelle shuntée, et s'éloigne de l'arc par le petit nombre de bandes qu'elle présente dans l'ultra-violet. Les courants de haute fréquence étant les plus maniables, et traversant avec facilité des substances peu ou pas conductrices, se montrent les plus appropriés à l'analyse quantitative et qualitative des organes animaux et végétaux. Enfin, le principal avantage que l'on trouve à leur emploi, en spectrographie biologique, est précisément l'étincelage direct des coupes et la possibilité d'une analyse histologique.

Cette nouvelle technique histochimique dérive de deux séries de recherches poursuivies indépendamment l'une de l'autre et à peu près en même temps, à Munich et à Bâle, d'une part, et à Lyon d'autre part. Voici, succinctement exposés, les principes généraux de ces techniques.

1° Travaux de Walter et Werner Gerlach.

a) Au cours de leurs recherches sur la microbiologie spectrale, *Walter Gerlach* (professeur de Physique à l'Université de Munich) et son collaborateur *E. Schweitzer* avaient mis au point la technique suivante. Un morceau de papier filtre sans cendres est imbibé de la solution à étudier, à laquelle on ajoute un électrolyte pour la rendre conductrice. Ce papier filtre est placé sur une lame de verre, et celle-ci est posée sur un petit plateau métallique mis à la terre et incliné.

Au-dessus du papier, on dispose une électrode en zinc reliée à l'appareil de haute fréquence ; de sorte que tout le système se comporte comme un condensateur intercalé dans un circuit secondaire de haute fréquence, reffermé par la terre, et après des essais ultérieurs, sur lui-même. La plaque de verre ne gênait pas le passage du courant, et l'étincelle jaillissait entre le papier filtre mouillé et l'électrode. On notera que dans cette technique le filtre ne devait pas être détruit ; si on le mettait directement sur le support métallique, il y avait carbonisation immédiate ; la plaque de verre avait pour but d'éviter cette destruction.

b) *Werner Gerlach*, frère du professeur *Walter Gerlach*, et lui-même professeur de pathologie à l'Université de Bâle, eut l'idée de placer une coupe histologique sur le papier filtre, et sous l'électrode. Cette coupe était mouillée et rendue conductrice par un électrolyte (Nitrate de Na à 10 % ; Acide chlorhydrique concentré.

etc...). Dans le spectre de l'étincelle ainsi obtenue, on retrouvait les raies caractéristiques des éléments renfermés dans la coupe ; et comme il était possible de déplacer celle-ci sous l'électrode et de faire jaillir l'étincelle à peu près à l'endroit prévu, l'histospectrographie était née.

2° Travaux de A. Policard et A. Morel.

Dans le même temps, A. *Policard* et A. *Morel*, professeurs, le premier d'Histologie, le second de Chimie organique, à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, avaient poursuivi des recherches microchimiques par la voie spectrographique. Ils appliquaient cette technique à la détection des éléments minéraux dans les cendres des tissus animaux, et en particulier sur des préparations incinérées (spodogrammes).

a) S'inspirant des travaux de A. de *Gramont*, G. *Urbain*, J. *Bardet* et de ceux, plus récents, de *Jolibois*, *Bossuet*, *Bayle* et *Amy*, ils avaient utilisé la technique suivante. Les cendres, en quantité minime (moins d'un milligramme) sont dissoutes dans une goutte ou deux d'acide chlorhydrique décimal. La solution est placée dans une petite cupule de platine, sur un plateau métallique relié à la terre et formant électrode inférieure.

Dans la solution plonge verticalement un petit *tube capillaire de quartz* transparent fondu, comme dans la

méthode de A. de Gramont ; dans le tube, par l'orifice supérieur, plonge un petit fil de platine relié à l'appareil de haute fréquence. L'extrémité du fil affleure la surface du liquide, qui monte dans le tube par capillarité. Lorsque le courant passe, le liquide est vaporisé, une colonne de vapeur lumineuse occupe l'intérieur du tube de quartz, et il ne reste qu'à enregistrer le spectre de cette lumière. Le tube silicieux a pour unique but de canaliser, en quelque sorte, l'étincelle, et d'éviter les projections de liquide sous l'influence de l'étincelle.

Avec cette méthode microchimique, et non histochimique, puisqu'elle nécessite une destruction par incinération, *Policard, Morel* et *P. Ravault* ont étudié qualitativement et quantitativement la répartition du *Ca* et du *Mg* dans la paroi de l'aorte normale et pathologique de l'homme. A la vérité, un procédé ingénieux de micro-prélèvements sur les pièces anatomiques, conférait déjà à cette technique un caractère histologique indubitable.

b) Pour obtenir une localisation précise de la destruction, et conférer à la méthode précédente un caractère vraiment histochimique, la coupelle en platine, décrite plus haut, fut remplacée par un coupe de tissus, imbibée d'acide chlorhydrique décimormal. On posait alors le tube de quartz sur un point de la coupe choisi au préalable, et on tâchait d'obtenir un spectrogramme de la colonne lumineuse, comme précédemment.

Les résultats furent peu satisfaisants, car le liquide imbibant la coupe était insuffisant pour entretenir l'étincelle, et celle-ci manquait de fixité. Elle était par ail-

leurs beaucoup trop faible pour libérer les éléments minéraux inclus dans la préparation.

c) Le tube de quartz fut alors simplement supprimé, et le fil de platine rapproché de la coupe. L'étincelle jaillissait alors dans l'air, et détruisait la coupe par carbonisation en un point bien précis, et le spectrogramme enregistré pendant cette destruction montrait les raies des éléments renfermés auparavant dans la partie détruite.

La méthode était devenue histochimique, et permettait une localisation.

Technique employée.

Nous allons exposer, à présent, le détail des opérations caractérisant cette méthode. telle qu'elle a été mise au point par *A. Policard* et *A. Morel*. Quant à la technique de *Wa. et We. Gerlach*, nous la passerons en revue dans la suite, non pour l'opposer, mais pour la comparer à la précédente. Ces techniques, nous le verrons, diffèrent surtout par des réalisations pratiques, ayant donné, toutes deux, des résultats du même ordre.

Schématiquement, la technique histospectrographique se décompose en plusieurs phases qui se succèdent ainsi :

1° Une coupe de tissu est faite et étalée sur une lame conductrice ; on la porte sur une platine spéciale et on repère l'endroit à étinceler au moyen d'un système optique grossissant.

2° On lance alors l'étincelle, produite par un appareil de haute fréquence, et dirigée par des électrodes convenablement choisies.

3° Cette étincelle projette son image dans un spectrographe, où elle s'enregistre sur une plaque sensible. Une fois les manipulations photographiques terminées, si l'on a pris garde d'éviter les multiples causes d'erreur, le spectrogramme obtenu caractérisera les éléments de la coupe.

L'étude des spectrogrammes sera faite plus loin.

Préparation et repérage de la coupe.

Les coupes.

Souvent des coupes très grossières, parfois même de petits fragments plats, seront suffisants ; c'est pourquoi tous les organes, même les plus durs, peuvent être étudiés. Les coupes seront exécutées à volonté dans les tissus frais ou dans des organes fixés. Ce dernier cas est évidemment le plus habituel, mais il est alors nécessaire de *bien connaître la composition du fixateur*.

Un fixateur contenant un ou plusieurs sels métalliques (liquide de Müller, de Zenker, de Lenhossek, etc.) donnera, dans le spectrogramme, les raies de ces métaux, ce qui est toujours un inconvénient. En effet, même si les métaux recherchés par l'analyse spectrale ne

sont pas les mêmes que ceux du fixateur, on n'a aucun avantage à s'embarrasser d'une multitude de raies parasites.

Les fixateurs à préférer seront donc ceux qui n'ajoutent rien et ne retranchent rien à la préparation, c'est-à-dire ceux qui ne renferment pas d'autres éléments que C, O et H, et qui, par ailleurs, ne sont pas acides et par là même susceptibles d'enlever aux tissus un certain nombre d'éléments minéraux.

L'alcool, et surtout le formol, sont à recommander ; à la rigueur, ce dernier peut même être salé sans inconvénient, étant donné l'abondance du chlorure de sodium dans les tissus.

Les coupes doivent être épaisses (200 μ au moins). Les coupes histologiques ne peuvent pas encore être employées. En effet, la méthode histospectrographique implique la destruction d'une zone de la coupe par un étincelage de 15 à 20 secondes au minimum. Les coupes trop minces (de 10 à 15 μ par exemple) sont détruites trop vite pour le temps de pose nécessaire, et, en un point intéressant, ne livrent à la destruction électrique qu'une quantité insuffisante d'éléments minéraux ; par ailleurs elles se dessèchent, se recroquevillent, et se volatilisent presque instantanément.

A ce point de vue, il est certain que dans l'avenir des perfectionnements seront apportés à la méthode ; peut-être sera-t-il possible un jour d'utiliser *des coupes d'épaisseur ordinaire*. Tel est du moins le but vers lequel il faut tendre ; mais il faut avouer que l'on ne voit pas encore, actuellement, la possibilité scientifique de l'atteindre.

Pour exécuter les coupes, le plus simple est de sectionner les fragments d'organes en tranches minces, à main levée, sur une plaque de liège, au moyen d'une lame de rasoir Gillette montée sur une pince. On les reçoit alors délicatement dans l'eau distillée, où elles s'étalent, et où on les reconnaît aisément. Elles sont ensuite reprises avec une petite pince très propre, et étalées sur la plaque conductrice formant électrode inférieure.

On enlève alors l'excès d'eau avec un fragment de papier filtre, sans toutefois les dessécher complètement. En effet, les coupes n'adhèrent pas au support, et à mesure qu'elles se dessèchent, sous l'influence du bombardement de l'étincelle, *elles tendent à se décoller*, à se recroqueviller, et même à jaillir au loin brusquement. C'est ce qui a lieu en particulier avec le cartilage. On est parfois conduit à réhumecter la préparation au cours des opérations. On peut aussi presser la coupe par une sorte de petit fer à cheval en verre, en quartz ou en toute autre matière isolante. L'étincelle se forme alors dans la concavité de ce petit fer à cheval, dont les branches, tournées en avant, circonscrivent le point frappé. Mais il est bien plus commode, pour éviter ce décollement, de faire adhérer la coupe au support à l'aide d'une *languette adhésive*, très étroite (2 à 3 mm. de large), à la manière d'un petit pansement. On trouve dans le commerce une bande de papier gaufré, recouvert sur une face d'un vernis adhésif (Durex Abrasives). On la colle simplement en pressant dessus ; elle se détache très facilement par traction, et sert pour ainsi dire indéfiniment.

Statif de repérage.

La nature du support portant la coupe mérite une étude détaillée qui sera faite plus loin ; il est placé sur la platine d'un microscope spécial qui est une des parties essentielles de l'appareillage.

Ancien appareillage.

Lors des premières recherches effectuées dans ce sens à Lyon, le dispositif était fort simple. Un petit statif de microscope était suspendu convenablement à la hauteur de la fente du spectroscope, et bien en face de celui-ci. Au moyen d'un objectif faible, on repérait un point de la coupe éclairé latéralement par une petite lampe annexe. Rappelons encore une fois que cet examen s'effectue en lumière réfléchie, et non par transparence, puisque le support de la coupe, placé sur la platine, est une plaque opaque, conductrice de l'électricité. Le statif était donc incliné légèrement, de telle sorte que la platine supportant la coupe fût en face de la fente. Dans le revolver porte-objectif, un des objectifs était remplacé par un bouchon de caoutchouc ou de bakélite, portant une aiguille métallique creuse. On utilisait simplement la base d'une aiguille de platine à injections hypodermiques, soigneusement centrée, reliée à l'appareil producteur de courant et formant ainsi porte-électrode supérieure. Par une simple rotation du revolver, cette aiguille venait se placer au-dessus du point repéré au préalable, à une distance fixe de 3 ou

4 mm., toujours la même. L'électrode, elle-même, était un simple fil d'or, de cuivre, ou de platine, suivant les cas, et bien entendu, en métal pur. Ce fil tenait de lui-même dans l'aiguille grâce à une légère coudure.

Comme il est indispensable de nettoyer fréquemment les électrodes, et comme l'électrode supérieure doit toujours occuper rigoureusement la même place, les fréquentes manœuvres du revolver, et toutes ces manipulations longues et délicates, occasionnaient une grande perte de temps. Mais le principal inconvénient de cette installation précaire était l'impossibilité de suivre par la vue la destruction histologique sur un territoire restreint ; on risquait ainsi de ne pas atteindre, ou de dépasser le but poursuivi.

Statif de Leitz.

Depuis, le dispositif a été très perfectionné. Sur les indications du Professeur Policard, la maison Leitz a construit une *platine à pignons, mobile dans les trois dimensions de l'espace* : verticalement, en long, et en large. Sur cette platine, on place le support de la coupe, qui peut y être fixé, si on le désire, par des valets. Le tout, comme précédemment, est légèrement incliné vers le collimateur du spectroscopie.

L'électrode supérieure verticale est solidaire également d'une crémaillère ; de sorte qu'on peut la rapprocher à volonté de la coupe, soit en abaissant l'électrode supérieure, soit en élevant la platine, selon les cas. Le mode de fixation de cette électrode supérieure au statif présente aussi quelque intérêt ; deux types sont utilisés.

Lorsque l'électrode est un simple fil métallique d'or ou de platine par exemple, il est commode de le loger

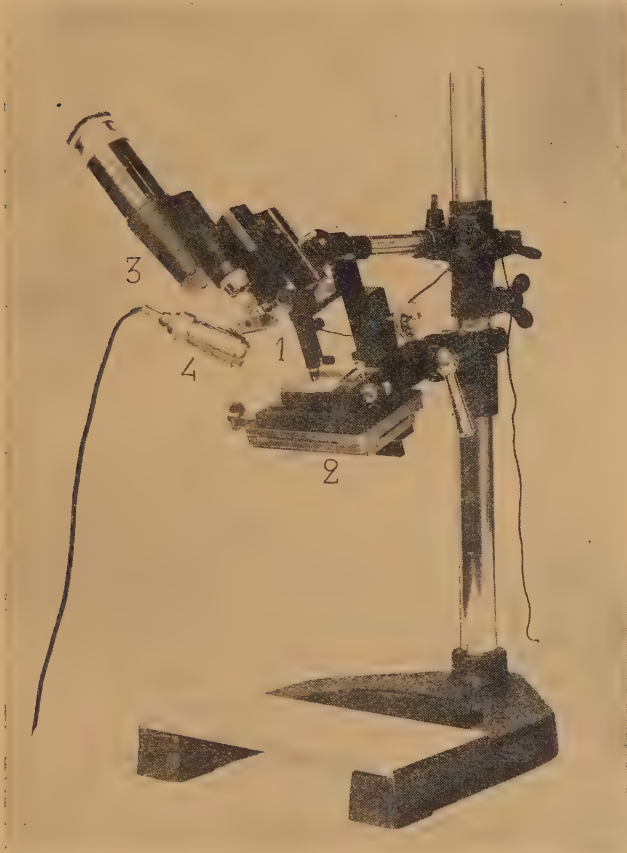


FIG. 1 : Platine spéciale pour l'histospectrographie.

- 1 : porte-électrode supérieur.
- 2 : platine mobile supportant la coupe.
- 3 : microscope de repérage en position normale.
- 4 : lampe auxiliaire.

dans un tube de verre capillaire, et de souder le verre au fil à son extrémité inférieure. De ce côté, le fil dépasse

le verre de 5 mm. environ, dans la direction de la coupe. De l'autre, il dépasse largement le tube, et cette extrémité est reliée à l'appareil de haute fréquence.

Parfois l'électrode a un diamètre trop grand — par exemple si l'on utilise de la mine de crayon ou du charbon reconstitué — ou bien elle présente un profil irrégulier — comme c'est le cas dans l'emploi du graphite. Il est alors plus commode de la monter sur un petit appareil qu'emploient les bijoutiers pour manier les pierres précieuses. C'est une sorte de porte-mine ou plutôt une pince à ressorts, avec trois mors filiformes et coudés qui s'écartent par pression. L'électrode est fixée entre les mors de cette pince ; et la pince, reliée à l'appareil de haute fréquence, est fixée elle-même au statif porte-électrode, par l'intermédiaire de tampons isolants.

Dans ce dispositif, le repérage microscopique se fait *au moyen d'une forte loupe, monoculaire, à prismes* (Leitz) ayant un objectif à longue frontale et un oculaire fort. Elle est indépendante de l'électrode supérieure, et peut être éloignée, rapprochée, ou inclinée plus ou moins, grâce à un support articulé. Une crémaillère permet la mise au point. Parallèlement à cette loupe, et monté à rotule, *un petit projecteur* est braqué sur la platine ; il comprend simplement *une petite lampe de colposcope*, à bas voltage, que l'on alimente avec le réseau urbain par l'intermédiaire d'un transformateur et d'un rhéostat. Le tout, projecteur, transformateur, rhéostat, ampèremètre, a été fourni également par la maison Leitz.

Grâce à cette loupe, on voit, avec un grossissement de 20 à 30, le porte-coupe, la coupe, et l'électrode supérieu-

re, que l'on avance par le jeu combiné des pignons jusqu'à 1 mm. ou 2 du point à étinceler. Il faut noter que la vue microscopique de la coupe se fait obliquement ; mais grâce à la grande profondeur de champ du système optique utilisé, cela est sans grand inconvénient ; l'image ainsi aperçue présente même un relief saisissant. On peut du reste augmenter encore cette profondeur de champ par l'addition d'un diaphragme en avant de l'objectif. Une fois la zone d'investigation bien repérée, on éteint le projecteur, et on ferme le circuit de haute fréquence ; et c'est alors un grand avantage de pouvoir contrôler au microscope les progrès de la destruction ; on voit grésiller et fondre littéralement le point frappé par l'étincelle.

Le dispositif d'étincelage.

Appareils de haute fréquence.

1° L'étincelle utilisée est une étincelle de haute fréquence fournie par un appareil convenable. Au début de leurs recherches effectuées à Lyon, les professeurs Policard et Morel utilisaient un de *ces petits appareils rudimentaires*, dont se servent les dermatologistes pour fulgurer certaines lésions cutanées. Ces appareils sont de prix modique, et de vente courante. Leur emploi est très commode et sans danger pour l'observateur. Ils se branchent directement sur le secteur 110 ou 220 V. :

leur électrode monopolaire est une poignée cylindrique en ébonite, contenant un enroulement et terminée par une tige métallique. C'est sur cette tige qu'on fixe un conducteur fin et très souple, reliant l'appareil à l'aiguille qui sert à l'étincelage. Mais, d'une part, les étincelles qu'ils débitent sont peu chaudes et peu énergiques ; et d'autre part, il ne s'agit pas là de haute fréquence à proprement parler, car le courant primaire est interrompu par un simple trembleur, et l'étincelle est mal nourrie. Il faut un étincelage prolongé pour obtenir une destruction notable des tissus ; une pose très longue est nécessaire ; les éléments minéraux ne sont pas toujours libérés ; enfin les raies caractéristiques de ceux-ci sont fréquemment couvertes par les bandes de l'air.

2° Pour toutes ces raisons, il est bien plus avantageux d'utiliser un appareil de haute fréquence plus puissant, comme celui dont se servent les physiciens et les chimistes s'occupant d'analyse spectrale. L'appareil utilisé actuellement dans ces recherches est *construit par la maison Ch. Beaudoin*, de Paris.

Cet appareil est constitué par un transformateur alimenté par le courant alternatif du réseau urbain (110 V, 50 périodes) ; la tension aux bornes du secondaire est d'environ 3.000 volts. Ce transformateur débite sur un éclateur à barreaux de tungstène ; l'étincelle de cet éclateur se trouve scindée en deux parties, et étalée sur plusieurs centimètres, condition favorable pour éviter la formation d'un arc, ou une excessive élévation de température ; la distance d'éclatement peut être réglée par un bouton moleté.

Aux bornes de l'éclaireur est monté un circuit oscillant, formé de deux condensateurs en série, réunis par une self plate, qui se trouve entre eux deux. Les deux extrémités de cette self sont reliées aux électrodes ; l'étincelle résulte donc uniquement de la tension haute fréquence créée aux bornes de la self plate ; cette fréquence d'oscillation est de l'ordre de 600.000

On notera que cet appareil étant bipolaire, l'électrode supérieure est reliée à un pôle, et la platine porte-objet à l'autre ; au contraire, avec le petit appareil ci-dessus, qui était monopolaire, la platine était simplement mise à la terre.

Des travaux récents ont montré tout l'intérêt que l'on a, en analyse spectrale, à utiliser une étincelle aussi constante que possible, et susceptible d'être reproduite ; cette constance est particulièrement désirable dans les recherches quantitatives. Or, l'étincelle de haute fréquence ordinaire se divise en plusieurs parties qui oscillent pour leur propre compte ; la décharge devient ainsi très irrégulière. On a intérêt à utiliser des étincelles très fortement « *amorties* » et même « *éteintes* »-; de telles étincelles sont obtenues par des artifices de montage, chargés d'éteindre la décharge, après un nombre constant et aussi petit que possible d'oscillations.

Pour la même raison, on proscrira les appareils à lampes, qui ne sont plus amortis du tout ; il est difficile avec de tels générateurs d'obtenir une tension suffisante et leur fonctionnement devient très onéreux ; enfin les spectres engendrés par l'étincelle qu'ils fournissent, sont assombris par de très fortes bandes.

Influence de l'énergie de l'étincelle.

On admet classiquement que dans un spectre les raies sont produites par les atomes des éléments, les bandes au contraire par les molécules.

La méthode histospectrographique *implique une destruction* par carbonisation du point étincelé ; il faut donc détruire la substance tissulaire d'une façon telle que ses atomes soient mis en liberté. Or cette destruction est plus ou moins rapide selon que l'étincelle est plus ou moins énergique et chaude, de sorte que les résultats obtenus sont très variables d'une installation à l'autre.

Habituellement, la destruction du point considéré est assez lente ; il faut d'abord que le surplus de l'eau s'élimine ; ensuite, l'étincelle de haute fréquence jaillit, ressemblant à un trait de feu, et calcine petit à petit les tissus.

Avec la première installation de haute fréquence ci-dessus décrite, les poses étaient de l'ordre d'une minute ou deux. Au contraire, l'appareil de Beaudoin a réduit le temps d'exposition à vingt secondes en moyenne. Ceci est déjà un avantage appréciable si l'on veut réduire le territoire histologique subissant la carbonisation.

Mais c'est à l'examen du spectrogramme qu'apparaissent les inconvénients d'un appareillage rudimentaire ou trop faible, car sans parler même de l'aspect des spectres, *il apparaît qu'avec une étincelle de peu*

d'intensité (1) la libération des atomes n'est pas complète. Certains éléments des plus importants échappent ainsi totalement à l'examen, s'ils se trouvent engagés dans des complexes organiques résistant à la destruction.

Une étincelle de faible énergie, issue du petit appareil de dermatologie, est appliquée à une couche de sang ; le spectre ne montre pas les raies caractéristiques du fer. Or, on sait que dans l'hémoglobine l'union du fer avec les molécules protéiques est très solide : elle n'a pu être disloquée par l'étincelle trop faible. En revanche, dans un foie atteint de siderose et bourré de rubigine, cette même étincelle suffit pour faire apparaître non seulement les raies ultimes, mais le spectre complet du fer. Cela tient à ce que les atomes du fer, dans le pigment ocre, sont unis lâchement au reste de la molécule. Autre exemple : dans certaines pneumoconioses minérales (silicose et silico-tuberculose) les poussières minérales sont simplement déposées dans le tissu pulmonaire sans être liées à lui chimiquement. L'étincelle très peu énergétique, employée dans la technique du début, fait apparaître admirablement, même avec une pose très courte, les raies du calcium et de la silice. Par contre, la même étincelle dans les mêmes conditions, n'est pas assez puissante pour libérer les ions identiques, mais solidement engagés dans les complexes protéiques d'autres tissus. C'est ainsi que l'on assiste à ce résultat paradoxal, que dans

(1) Ce mot est pris dans son sens le plus large et englobe toutes les caractéristiques de l'étincelle : voltage, intensité, fréquence, température, etc...

certains cas de rachitisme traité, le calcium apparaît dans le cartilage, alors qu'il est invisible dans l'os.

Or, les auteurs allemands Wa. et We. Gerlach nient que des différentes modalités de l'étincelage on puisse « tirer une conclusion sur la liaison des métaux » avec les éléments organiques.

« Lorsque, disent-ils, avec notre appareillage de haute fréquence, nous étincelons pendant quelques secondes seulement une goutte de sang, nous obtenons sur le spectrogramme non seulement quelques raies du fer, mais son spectre tout entier ». En réalité, cette affirmation de ces auteurs ne va nullement à l'encontre des résultats énoncés plus haut, mais prouve seulement la puissance de leur installation.

De cette série de faits on peut tirer une double conclusion. C'est, tout d'abord, que pour détecter tous les éléments d'une préparation, il faut *une étincelle énergétique* et chaude, autrement dit qu'il est nécessaire d'utiliser un appareillage puissant. Le petit générateur de haute fréquence employé au début était manifestement par trop rudimentaire.

En second lieu, il est intéressant d'introduire dans le primaire de l'appareil de haute fréquence une *résistance variable*, sous forme d'un rhéostat assez puissant; on peut ainsi obtenir toute une gamme d'étincelles d'énergie croissante. Toutes choses égales d'ailleurs, ce dispositif permet des recherches au moins approximatives, sur le degré de solidité avec laquelle un élément est lié aux substances tissulaires.

Lorsqu'on utilise à plein toute l'énergie de l'appareil, on obtient une sorte d'arc éblouissant et très chaud,

qui donne un spectre extrêmement riche avec une pose très courte. Or, circonstance heureuse, cette variété d'étincelle peut également être obtenue avec des appareils relativement très peu puissants, sans changer quoi que ce soit au dispositif déjà décrit ; on rapproche simplement la coupe au contact même de l'électrode supérieure, et il arrive un moment où l'arc jaillit.

En réalité, si ce terme « *d'arc* » fait image, il n'est pas physiquement très correct. L'arc est continu, ou du moins présente des variations lentes et continues, tandis que notre étincelle est la traduction d'une décharge oscillante ; elle se rapproche, par certains côtés, de ce que les physiciens appellent « *arc flamme* » ou encore « *arc de haute tension* » (Flammenbogen-Hochspannungsbogen). Les étincelles de ce genre sont courtes et épaisses, entourées d'une auréole, et ressemblent à une flamme. Elles se distinguent de l'étincelle linéaire de haute fréquence par deux points essentiels : tout d'abord, elles sont *excessivement blanches et chaudes* ; en un clin d'œil, l'eau de la coupe est vaporisée, et la coupe elle-même se calcine en quelques secondes. Lorsqu'on étudie des solutions au moyen de l'arc-flamme, l'électrode liquide doit être refroidie, sinon la solution disparaît purement et simplement. Les électrodes métalliques elles-mêmes souffrent de cette haute température ; elles fondent, et le métal en fusion se ramasse en une petite boule à l'extrémité du fil. En second lieu, ces pseudo arcs donnent *des spectres extrêmement riches* et particulièrement intenses, où les raies de tous les éléments présents dans la coupe apparaissent nettement. Ces raies sont, du reste, toujours celles des étincelles,

jamais celles des arcs. On sait en effet que, pour un même élément, il y a des différences entre les spectres d'arc et les spectres d'étincelle, différences tenant à ce que le spectre d'arc est produit par l'atome neutre, et le spectre d'étincelle par l'atome ionisé.

L'utilisation de semblables « *étincelles-flammes* » est donc avantageux à un double point de vue; d'abord parce qu'elles permettent de tirer parti d'une installation trop peu puissante; d'autre part, parce qu'elles libèrent, en quelques secondes, la totalité des éléments de la coupe. Elles présentent toutefois un léger inconvénient: c'est que, du fait de la très haute température à laquelle sont soumises les électrodes, les raies caractéristiques de celles-ci apparaissent sur le spectre avec une particulière intensité.

Le choix des électrodes.

Le choix de la substance des électrodes est d'une grande importance, car les raies de cette substance constituent le « *fond* » même du spectre obtenu. L'étude de ces raies sera reprise plus loin, et envisagée dans ses rapports avec les raies émises par la préparation. En ce qui concerne la nature même des électrodes, un grand nombre de substances conductrices ont été essayées.

Le Platine :

Le platine a toujours été employé par les spectrographes, en raison de son inaltérabilité, et de son point de

fusion très élevé (1770°). L'électrode supérieure est constituée par un fil de 2 à 3/10 de mm. de diamètre, épaisseur suffisante dans la technique courante, toutefois, si l'on utilise « l'étincelle flamme » comme moyen de destruction, il est prudent de prévoir un diamètre plus fort. Le support de coupe, qui forme électrode inférieure est une lame de platine, bien plane, de 1 à 2/10 mm. d'épaisseur, sur laquelle est déposée la coupe.

Mais le platine présente, dans la pratique, deux inconvénients qui neutralisent les avantages indiqués plus haut. Il offre un nombre immense de raies, et fournit pour cette raison un spectre très embrouillé et difficile à lire. Mais surtout il est très rare d'avoir du platine bien pur, et l'on doit compter avec ses nombreuses impuretés. Le platine de bijouterie est à rejeter d'emblée, car on y trouve de très nombreux métaux parasites, Cu, Pb, Si, Ca, Mg, etc..., provenant du minerai ou des creusets de fusion. Même le platine dit « très pur » renferme encore des traces de Cu, et parfois de métaux lourds ; il doit être rejeté pour la recherche du Cu, et ne sera employé que pour celle du Ca, du Mg et du Si.

L'Or.

L'or offre les mêmes inconvénients ; s'il est presque aussi inaltérable, son point de fusion est peu élevé (il se ramollit vers 800° et fond à 1040°) et avec une étincelle très chaude la pointe de l'électrode supérieure peut fondre et donner une boule. D'autre part, il est rarement pur. L'or des joailliers renferme toujours du cuivre et souvent de l'argent. L'or extra-pur (or « vier-

ge ») se trouve assez facilement dans le commerce, mais il est également suspect et contient des traces de cuivre. Par contre, l'or possède un avantage considérable : il présente surtout dans l'ultra-violet, des raies bien caractéristiques et bien nettes, peu nombreuses et bien espacées. Par là il se montre nettement supérieur au platine, et ces avantages lui ont donné la première place en spectrographie biologique.

L'Aluminium.

L'aluminium, spécialement recommandé par *Okajima* pour l'analyse spectrale, se trouve facilement à l'état très pur, en raison de son mode de préparation industrielle. Ses raies n'interfèrent pas avec les raies de Cd, Ag, Au, et Pb, corps spécialement étudiés par cet auteur. Mais son point de fusion est peu élevé (625°) ; aussi est-il peu employé comme électrode en contact direct avec l'étincelle.

L'Iridium.

L'iridium a pour principal avantage de ne fondre qu'à 2.500°. Son emploi a été conseillé par *A. de Gramont* et par *G. Urbain* pour l'étude des solutions au moyen de l'étincelle condensée. Il remplacerait avantageusement le platine, si son prix n'était pas si fort ; en effet, son point de fusion est encore plus élevé ; il contient moins d'impuretés, et, surtout, son spectre est beaucoup moins riche en raies.

Métaux divers.

Divers autres métaux ont été essayés, en particulier le *Zinc* et le *Fer*. Mais leur spectre fourmille littéralement de raies, et ces métaux s'altèrent spontanément avec une grande rapidité. Le *Cuivre* présente les mêmes inconvénients, mais on peut l'avoir assez pur (cuivre électrolytique).

Le Carbone.

On trouve de grands avantages à l'emploi du *Carbone* comme électrode, car cette matière est rigoureusement inaltérable, et pratiquement infusible. Le charbon de cornue est rempli d'impuretés, et le charbon reconstitué aussi ; par contre, le *graphite* naturel n'en renferme qu'une quantité assez restreinte et son emploi est satisfaisant. On se procurera des échantillons de graphite le plus dur possible, comme celui des mines de Ceylan ou mieux encore de Madagascar. Dans un fragment, on taille avec une scie à métaux et on polit sur une meule une plaque de 3 cm. de long sur 2 cm. de large et 3 ou 4 m/m d'épaisseur. Cette plaque constitue l'électrode inférieure ; elle est simplement posée sur la platine du statif, et recevra la coupe. L'électrode supérieure est faite d'un éclat de graphite taillé en pointe, convenablement limé, et nettoyé par friction sur un papier filtre rugueux.

Ces électrodes en carbone sont très avantageuses pour la recherche du Cu, Au, Ag. Les raies propres du carbone qu'elles émettent ne font que renforcer

celles que fournissent toutes les coupes. Mais, comme le graphite renferme constamment Ca, Si, Mg, Fe, il est inutilisable pour la détection de ces métaux ; l'or est dans ce cas tout indiqué.

Pour des recherches portant sur un seul élément, comme le dosage de l'or ou du cuivre par exemple, ou bien lorsqu'on désire une localisation plus fine, on peut utiliser comme électrode supérieure, non pas un éclat de graphite, mais une simple mine de crayon (genre Eversharp) très mince et de bonne qualité, c'est-à-dire sans plomb. On taille cette mine en une pointe longue et très aiguë, et on la polit comme le graphite, qu'elle remplace avantageusement. Mais en raison de la haute température à laquelle est portée l'électrode supérieure pendant l'étincelage, le graphite et la mine de crayon ne tardent pas à se recouvrir de cendres. Bientôt l'étincelle aurait peine à se frayer un passage à travers un véritable champignon d'oxydes métalliques et deviendrait très irrégulière. Mais, comme les nécessités de l'analyse obligent à changer l'électrode ou à la nettoyer à chaque examen, cette éventualité ne se produit jamais.

Conclusion.

En conclusion, il ressort de cette énumération, que chaque métal conducteur présente, en tant qu'électrode, des avantages et des inconvénients. Du fait de ses impuretés, et, comme on le verra plus loin, à cause de ses raies, *chacun doit être choisi avec soin, pour être approprié à la recherche en cours.* Il faut d'une façon

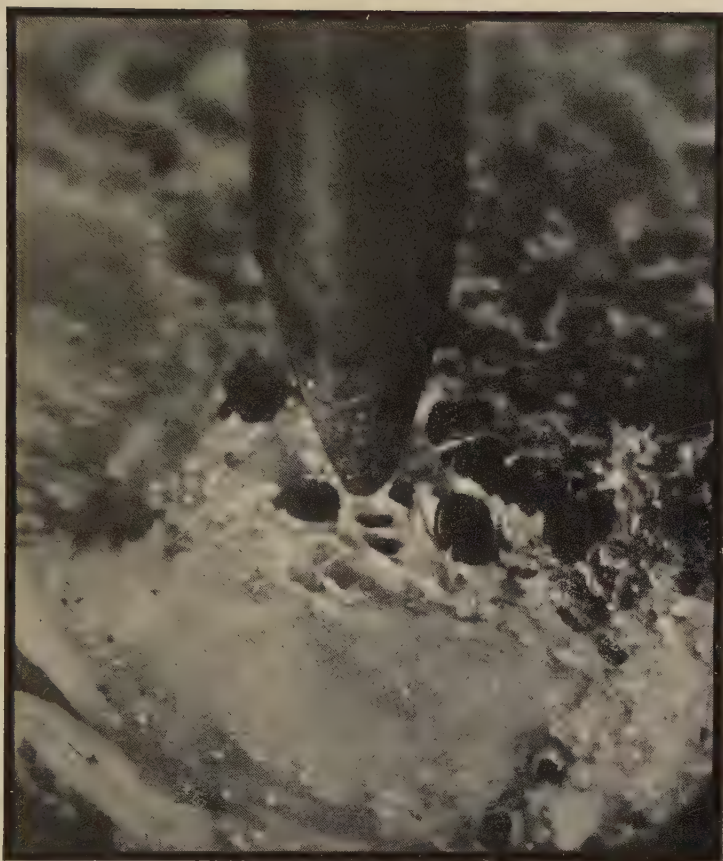


FIG. 2 : Photographie prise à travers le microscope de repérage. En bas, une coupe de poumon silico-tuberculeux est éclairée par le projecteur à bas voltage : au premier plan, un gros point caséeux. Au-dessus de la coupe plonge l'électrode supérieure en graphite (mine de crayon), utilisée pour la détection de l'or dans la coupe.

Grossissement : $\times 300$.

Cliché M. Boucharlat (Service photographique de l'Institut d'Histologie).

Plaque « Micro » Lumière.

absolue que l'électrode ne renferme aucune trace décelable spectroscopiquement de l'élément à rechercher. Voilà pourquoi, avant de prendre un spectrogramme, il faut enregistrer en premier lieu sur la plaque un *spectre témoin* de l'étincelle jaillissant exclusivement entre les électrodes. Cette précaution est rigoureusement indispensable.

Les spectrographes. Prise d'un spectrogramme.

Les spectrographes.

La description des divers spectrographes n'est pas à faire ici ; pour les recherches dans l'ultra-violet, tous comportent des lentilles en quartz, ou en quartz-fluorine. Les réseaux ne sont pas employés, en raison de la perte de lumière qu'ils occasionnent ; on leur préfère les prismes en quartz.

Deux qualités sont exigibles d'un spectrographe : la *luminosité* et le *pouvoir dispersif* ; mais ces qualités s'excluent généralement.

Les spectrographes très lumineux sont particulièrement commodes pour des recherches biologiques, car ils permettent d'abréger beaucoup le temps de pose ; ils seront avantageux pour des recherches quantitatives, à condition que les spectres ne soient pas trop

chargés en raies. Si, en plus, on travaille avec une fente plutôt large, on obtient des lignes peu précises, à la vérité, mais épaisses et bien nuancées, et très lisibles au photomètre.

Mais lorsqu'on étudiera des spectres très riches, pour déchiffrer des raies très proches l'une de l'autre, on se servira nécessairement d'un spectrographe dispersif ; on arrive ainsi à décomposer la plupart des « *bandes* » ou à résoudre des « *coïncidences* » de lignes spectrales. L'on a toujours aussi la ressource d'augmenter la largeur de la fente, si l'on désire admettre un peu plus de lumière ; la précision des mesures est encore la plupart du temps suffisante, étant donnée la grande dispersion.

L'idéal serait de posséder plusieurs appareils, ayant chacun ses qualités propres ; malheureusement, le prix des grands spectrographes est le plus souvent prohibitif, et le matériel photographique, lui aussi, à la longue, constitue une grosse dépense. Dans la pratique, on peut s'en tenir à un compromis et choisir un appareil joignant, à une luminosité suffisante, une dispersion assez grande pour la lecture des spectrogrammes courants, avec une fente de 2/100.

Nous nous sommes servis, jusqu'ici, d'un petit spectrographe d'*Hilger* (Londres), modèle *E.31*. Les spectres représentés plus loin ont été pris avec cet appareil, qui suffira le plus souvent. Cependant, un spectrographe plus dispersif est à recommander : depuis quelque temps, nous utilisons le grand modèle *C* de *Leiss*, qui donne des spectres particulièrement lisibles, et dont les raies ont une bonne « *définition* », dans la zone habituellement la plus riche de l'ultra-violet.

Mise au point de l'étincelle sur la fente.

Quel que soit l'appareil utilisé, la technique est la même. L'image de l'étincelle est projetée sur la fente du collimateur par une lentille cylindrique en quartz. Cette lentille est mobile d'avant en arrière et permet une mise au point parfaite sur la fente. En raison du caractère cylindrique de cette lentille, l'image de l'étincelle est une ligne ; il faudra veiller à ce que cette ligne soit aussi mince et aussi brillante que possible. Pour avoir des raies bien nettes, la fente du spectroscopie doit être *très étroite*. Si elle est plus large, une plus grande quantité de lumière est admise ; et cette quantité varie comme le carré de cette largeur ; le temps de pose est naturellement diminué d'autant. Mais avec des fentes larges, les raies sont plus épaisses, floues, et mal définies ; les bandes sont compactes, et les doublets même se confondent, de sorte qu'au voisinage de la limite de sensibilité, pour des quantités infimes de minéraux, l'identification de ceux-ci devient impossible. Il est vrai qu'en temps ordinaire, lorsqu'on recherche un élément abondant, on peut se contenter de très mauvais spectrogrammes.

Il faut veiller avec le plus grand soin au *bon état de la fente*. Entre les examens, le collimateur à fente sera renfermé dans un capuchon mobile, livré avec l'appareil. Pendant les recherches, des poussières viennent souvent se coller sur la fente, et portent ombre sur les clichés. Leur présence se traduit sur les négatifs par

de longues rayures blanches, longitudinales, qui à la vérité ne gênent en rien la lecture des spectrogrammes.

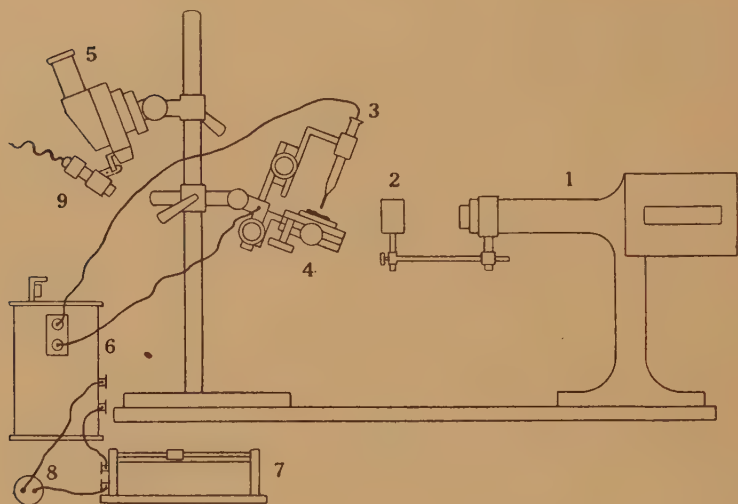


FIG. 3 : Disposition générale des appareils.

- 1 : spectrographe en quartz d'Hilger.
- 2 : lentille cylindrique en quartz.
- 3 : porte-électrode supérieur avec sa crémaillère.
- 4 : platine mobile recevant la coupe et formant électrode inférieure.
- 5 : microscope de repérage, déplacé vers la gauche.
- 6 : appareil de haute fréquence de Beaudoin.
- 7 : rhéostat sur le primaire.
- 8 : prise au secteur.
- 9 : lampe auxiliaire (projecteur de colposcope) à bas voltage.

Le véritable inconvénient des poussières, c'est la difficulté que l'on rencontre pour les enlever ; en effet, les couteaux mobiles qui forment les parois de la fente sont rigoureusement rectilignes et polis ; une intervention

malencontreuse avec un instrument trop dur risquerait d'écorcher les arêtes des couteaux. C'est pourquoi on proscrira l'emploi des aiguilles en acier ou en verre étiré ; on nettoiera la fente, après l'avoir élargie, avec un stylet de bois à grain fin, du buis par exemple. Ceci, qui peut sembler au premier abord un détail élémentaire, a, en fait, une grosse importance.

La projection de l'étincelle sur la fente doit être envisagée *dans le sens horizontal* et *dans le sens vertical*. Dans le sens horizontal : doucement on déplace à droite ou à gauche le spectrographe tout entier. Pour exécuter cette translation, il est avantageux de le monter sur une plateforme déplaçable dans une glissière, au moyen d'une vis et d'un ressort de rappel. Dans le sens vertical, ce sont les électrodes que l'on déplace, et leur position sera vérifiée pour chaque examen ; c'est la partie inférieure de l'étincelle, à son point de contact avec la coupe, qui doit se projeter au milieu de la fente ; ce point sera donc amené préalablement dans l'axe optique général de la lentille et du collimateur. Ultérieurement, l'une au moins des électrodes devra nécessairement rester fixe ; et l'on choisira, comme électrode, mobile de préférence, celle que l'on changera pour les besoins de l'examen.

Plaques photographiques.

a) *Le support et le format.*

L'image spectrale de l'étincelle se forme derrière le prisme, suivant une courbe appelée *diacaustique*. Pour

obtenir des spectrogrammes parfaitement au point, il faudrait faire épouser à la surface sensible la courbe de la diacaustique. Or, à mesure que l'on s'éloigne dans l'ultra-violet, cette courbe tend à se redresser et à devenir une droite. Aussi, de plus en plus, les constructeurs cherchent-ils à employer des plaques rigides ; on « *incline* » alors le châssis photographique, de manière à obtenir une mise au point moyenne, qui n'est vraiment fixe qu'au voisinage des points où la plaque coupe la diacaustique.

Avec le petit modèle E 31 d'Hilger, dont nous nous sommes servis, les plaques mesurent 82×107 mm., et ne sont pas de vente courante en France ; mais avec une légère modification du châssis, l'appareil admet le format international de projection ($8,5 \times 10$ cm.).

Par contre, d'autres spectrographes, et surtout les grands appareils très dispersifs, exigent que la surface sensible épouse exactement cette courbe ; on utilise alors des pellicules souples, que l'on applique dans un gabarit courbé qui sert de châssis, et dont la forme a été déterminée à la construction par le calcul et l'expérience. Malheureusement, l'emploi des films présente quelques sérieux inconvénients. D'une part, la minceur des films du commerce (*Rollfilms*) se prête très mal aux manipulations ultérieures exigées par le dépouillement des raies ; et seuls les supports en celluloïd épais (*Planfilms*, *Radiofilms*) résistent un peu à la chaleur dégagée par la lanterne du comparateur de spectres. En second lieu, le choix des émulsions susceptibles de se couler sur film est extrêmement réduit, si bien que pour des

formats un peu grands, on ne trouve plus, dans le commerce, que l'émulsion radiographique.

Pour ces deux raisons, l'emploi d'une plaque est toujours préférable. Mais lorsqu'il s'agira de la cintrer, on emploiera nécessairement du verre extra-mince de 7 à 8/10 dont les fabricants de plaques ont toujours une petite provision. C'est ainsi que pour le grand modèle de Leiss (Berlin), la maison Lumière nous livre couramment le format spécial de 5×24 cm. en verre de 8/10 qui se laisse parfaitement courber et ne casse jamais.

b) *L'émulsion.*

La question de l'émulsion n'est pas sans importance. Les plaques *orthochromatiques* ou *panchromatiques*, même les plus rapides, donnent dans l'ultra-violet de médiocres résultats ; les colorants qui servent à les sensibiliser, et d'autres encore que l'on introduit tout exprès dans la gélatine, agissent comme de véritables écrans, vis à vis des rayons les plus réfrangibles du spectre.

On se trouvera bien d'utiliser une bonne émulsion courante, au bromure d'argent, joignant à un grain très fin une sensibilité déjà élevée. Il semble avantageux, mais non indispensable, que le support soit muni d'une couche dorsale anti-halo. Les émulsions « *Sigma* » ou « *Etiquette bleue* » Lumière, par exemple, conviennent parfaitement.

Certains auteurs recommandent les plaques photo-mécaniques à grain très fin : leur émulsion, assez sensible aux radiations courtes, donne des raies très dures,

exemptes de diffusion. Cependant, comme elles ont une tendance à la dureté, exagérant ainsi les contrastes au détriment des raies les plus faibles, leur emploi n'est pas à conseiller.

c) *Les plaques spéciales.*

La gélatine des émulsions a le défaut d'absorber une quantité notable de radiations, surtout dans le court ultra-violet. Pour obvier à cet inconvénient, certaines maisons préparent des plaques spéciales (*Plaques Schumann, plaques Barnard*), dont l'émulsion est coulée de manière à être très riche en argent et très pauvre en gélatine. Avec un équipement optique convenable, les plaques ainsi préparées sont sensibles jusqu'au voisinage des « *rayons de Schumann* », et l'on n'est plus alors limité dans le sens des très faibles longueurs d'ondes, que par l'absorption de ces rayons par l'air. Malheureusement, ces plaques sont rares et fort chères, et de plus, par le fait de leur pauvreté en gélatine, excessivement délicates.

d) *La sensibilisation.*

Si l'on désire pousser la sensibilité d'une émulsion dans l'invisible, et l'étendre jusqu'à l'extrême ultra-violet, on la traitera selon la technique de *Duclaux* et *Janet*, par l'anthracène ou l'huile de graissage. La plaque sera, par exemple, enduite d'une solution ainsi composée :

{	Huile de vaseline :	5 gr.
	éther de pétrole :	1000 cc.

On peut aussi, comme le remarque W. Gerlach, étendre tout simplement sur la plaque, avec le doigt, une petite goutte d'huile de machine faiblement jaunâtre. Mais, comme la couche d'huile diminue la sensibilité de l'émulsion dans le grand ultra-violet, on ne doit sensibiliser qu'au-dessous de 2.400. Cette méthode est employée par les astronomes et donne d'excellents résultats ; on enregistre ainsi jusqu'à 1830 Å environ ; seulement, avant de développer, il faut nécessairement enlever la couche d'huile, en traitant la plaque par le xylol ou l'acétone (l'éther entraîne fréquemment un voile accentué de l'émulsion). Ce nettoyage complique beaucoup les opérations.

Une autre technique, beaucoup plus simple et plus propre, a été préconisée par *Thovert*. La plaque est immergée dans une solution alcoolique à 1 % d'acide salicylique, ou d'un salicylate alcalin. Le radical salicylé agit alors, comme du reste l'huile de graissage, par la fluorescence très actinique qu'il présente dans l'ultra-violet.

Les plaques retirées aussitôt, se séchent en quelques instants, et se conservent ensuite parfaitement. On peut ainsi en faire toute une provision, que l'on développera plus tard sans aucun traitement préalable.

Mais une question se pose. Faut-il sensibiliser ? En réalité, dans la pratique biologique, les exigences spectrales ne sont pas les mêmes qu'en astronomie par exemple, et si l'on excepte quelques examens, entre autres les recherches quantitatives du mercure, du cadmium et du zinc, la plupart du temps les émulsions ordinaires sont largement suffisantes, et l'on n'aura aucun

intérêt à modifier leur sensibilité. En effet, cette sensibilisation apporte encore une inconnue dans une question où il est bien difficile, déjà, d'obtenir des résultats constants. Aussi, en ce qui concerne le choix de la surface sensible, on pourra le plus souvent s'en tenir à un petit lot de plaques courantes, connues, commodés, et délaissier les surfaces spéciales ou les procédés d'exception.

Le temps de pose.

La durée du temps de pose dépend de deux facteurs : sensibilité de la plaque en fonction de la luminosité du spectrographe, et nécessité de détruire totalement la fraction de tissu frappée par l'étincelle. Car la difficulté consiste non pas à obtenir le spectre de l'étincelle, mais à libérer par celle-ci tous les éléments minéraux présents au point considéré, ce qui implique nécessairement la destruction de la coupe à ce niveau. Or cette destruction, qui est le fait essentiel, peut être plus ou moins complète et plus ou moins rapide. Analysons les phases successives de la méthode.

a) Les différentes phases de la méthode.

Au début, nous sommes en présence d'une coupe humide, dont l'excès d'eau sera pompé au moyen de fragments de papier-filtre sans cendre, que l'on applique sur elle. On repère le point à étudier, et la lumière est coupée ; on lance enfin l'étincelle, qui hésite durant

quelques secondes, si la coupe est très humide, et se comporte alors comme une sorte d'aigrette mauve.



FIG. 4 : Etincelage d'une coupe de poumon.

La lampe auxiliaire est éteinte et l'étincelle jaillit dans le tissu alvéolaire qu'elle détruit.

Cette photographie, prise comme la précédente, montre bien la finesse de la localisation.

Mais presque aussitôt la coupe est échauffée ; l'étincelle proprement dite jaillit. Presque instantanément, la coupe se dessèche au point frappé et la carbonisation

commence. Depuis la fermeture du circuit, vingt secondes au plus se sont écoulées ; c'est à ce moment que l'on ouvre le châssis photographique ; l'étincelle est alors très lumineuse et très actinique, et sa couleur est à peine modifiée par les éléments minéraux qu'elle libère. Elle est, de plus, parfaitement fixe, et point n'est besoin de surveiller sa projection sur la fente quand la mise au point a été vérifiée au début.

b) Surveillance de la destruction.

On a donc tout le temps de surveiller dans la loupe les progrès de la destruction, et de régler le temps de pose sur sa marche. Cette pose est en général courte, et ne varie guère avec la nature de l'organe en cause ; il est à remarquer, cependant, que les grands organes parenchymateux se carbonisent avec rapidité, tout au contraire des organes graisseux, dont la calcination est plus lente à s'établir. Mais le temps de pose dépend avant tout de la puissance de l'étincelle. Quand celle-ci est peu énergique, elle est beaucoup moins actinique et surtout beaucoup moins chaude ; les tissus se calcinent mal, la pose s'allonge et finit par atteindre 30 secondes, 40 secondes, et même une minute. C'est alors que la coupe, battue longuement par l'étincelle, finit par se dessécher dans sa totalité, et risque au maximum de se décoller si l'on n'y prend garde.

Au contraire, avec une étincelle très énergique et très chaude, le dessèchement reste localisé à un petit territoire, et la carbonisation va bon train. La pose se réduit à 15 ou 20 secondes en moyenne, mais si l'examen présente quelque difficulté, on peut toujours gagner du

temps en diminuant un peu la puissance au primaire ou en réhumectant la coupe. Ordinairement, le territoire calciné est si réduit, qu'après l'action de l'étincelle la coupe semble percée d'un minuscule trou rond, comme fait avec une mince aiguille rougie au feu ; en sorte

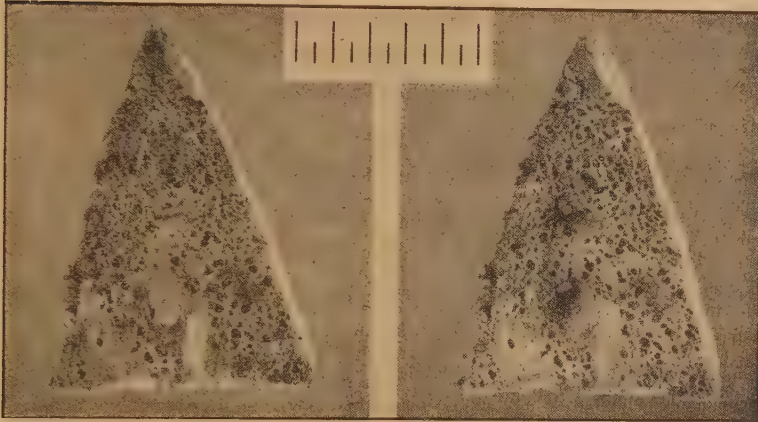


Fig. 5 : Poumon tuberculeux.

A gauche, coupe encore humide.

A droite, la même coupe étincelée, dont on remarque l'aspect flétri. On y voit deux trous creusés par l'étincelle, l'un en plein parenchyme, l'autre en bordure d'un nodule caséeux. (Chaque petite division de l'échelle représente 1 mm.)

que, d'un point intéressant, on peut souvent tirer plusieurs spectres successifs, et que la certitude se renforce d'autant.

Enfin, lorsqu'on approche l'électrode supérieure au contact de la préparation, et qu'on utilise « l'étincelle-flamme » comme mode de destruction, le temps de pose peut devenir extrêmement court : 5 à 10 secondes suffi-

sent souvent. Il faut alors être bien sûr de son repérage; mais si l'on considère la petitesse du point détruit, la perfection de cette destruction, et la rapidité des résultats, il est permis de songer que l'histospectrographie retirera de cette dernière technique une notable partie de ses progrès futurs.

Développement des clichés.

En ce qui concerne le développement, il n'y a pas grand' chose à dire. Tout bon révélateur peut servir; le plus commode est à base de génol-hydroquinone, et on le trouve partout en solution concentrée ou en cartouches toutes prêtes pour la dissolution.

— Si l'on désire des contrastes, on poussera au bromure.

— Si l'on veut intensifier les noirs, on remplacera le carbonate de soude par du phosphate tribasique.

— Si l'on tient au contraire à la finesse du grain, pour de forts agrandissements ultérieurs, on utilisera avec avantage le révélateur au borax, en cuve verticale, ou mieux encore celui à la paraphénylène diamine.

Le seul point à recommander ici est d'utiliser constamment la *même formule de révélateur*, pour permettre des comparaisons entre les différents clichés. On aura soin de toujours employer autant que possible un bain neuf, et lorsqu'on aura plusieurs plaques, de les développer ensemble. Enfin, toutes les conditions de

température étant les mêmes, on développera toujours à fond et dans le même temps.

Formules pour grain fin.

Génol	2 gr.
Hydroquinone	5 gr.
Sulfite de soude anhydre	100 gr.
Borax	2 gr.
Eau q. s. p.	1000 cc.

Développer 5 minutes,

ou bien diluer à 25 % et développer 40 minutes en cuve verticale.

Eau	1000 cc.
Paraphénylène-diamine	10 gr.
Sulfite de soude anhydre	60 gr.
Phosphate trisodique	2 gr.
Bromure de potassium à 10 %	10 cc.

Les erreurs.

Une fois le développement terminé, il reste à examiner successivement les différents spectres enregistrés sur la plaque, c'est-à-dire à effectuer le numérotage de leurs raies. Il ne faut pas se dissimuler qu'il s'agit là d'un travail toujours long et délicat ; il ne faut pas oublier non plus que ce travail risque d'être vain, si une

faute de technique est venue se glisser lors des opérations précédentes. Or, l'analyse spectrale, qui est d'une extraordinaire sensibilité, par le fait de cette sensibilité, expose à des erreurs nombreuses. Il importe donc de passer celles-ci en revue.

Les fautes de technique.

Les fautes de technique sont en général grossières et facilement évitables.

1° *L'étincelle ne jaillit pas* ; un léger effluve mauve la remplace : la coupe est trop éloignée de l'électrode, trop mouillée ou trop épaisse.

2° *Le spectre est faible dans sa totalité* ; les raies sont pâles, le fond complètement transparent. Sous-exposition. On bien léger déplacement latéral du spectroscopé : l'image de l'étincelle est décalée sur la fente.

3° *Sur le spectre, les raies sont penchées* ; ceci provient du fait que le tambour portant la fente réglable a tourné sur lui-même de quelques degrés. Cet accident ne se produit pas dans les spectrographes bien construits, où le tambour peut être bloqué par friction.

4° *Une extrémité de toutes les raies va en palissant* : de sorte que l'un des bords de chaque spectre est net, et l'autre illisible. Ceci est un accident fréquent qui relève de plusieurs causes :

— La lentille cylindrique s'est déplacée et une extrémité seulement de la fente est éclairée ; le remède est

aisé, mais on peut déplorer le peu de soin que certains constructeurs apportent à la partie purement mécanique de leurs appareils.

— L'étincelle s'est déplacée vers le haut ou vers le bas, suivant ainsi le système des deux électrodes, lequel a pu se dérégler d'un examen à l'autre. En effet, la mise au point doit être vérifiée après chaque nettoyage des électrodes, en raison de l'usure de celles-ci.

Cette usure appelle quelques réflexions. Prenons tout d'abord le cas où les électrodes sont en métal, or ou platine, par exemple ; leur nettoyage à l'acide nitrique ne les modifie pas ; il est aisé de les couper de la même longueur, si l'on désire en faire une petite provision. En sorte que l'électrode supérieure peut être considérée comme fixe, et que l'on évitera de la monter et de la descendre ; en effet, de cette fixité dépend celle de l'étincelle. Ce sera donc l'électrode inférieure que l'on manipulera, au moyen de sa crémaillère, à chaque changement de coupe. C'est, du reste, la manœuvre la plus aisée.

Prenons, au contraire, le cas des électrodes de graphite. Ce minéral est tendre et s'use très rapidement ; l'électrode inférieure est une lame polie, qui résiste relativement au choc de l'étincelle ; par contre, l'électrode supérieure s'émousse en quelques secondes et se couvre bientôt d'un champignon d'oxydes métalliques inclus en elle ; il faut la changer sans cesse. On peut donc la considérer comme électrode mobile ; et c'est elle qui sera élevée, puis abaissée pour permettre les change-

ments de coupe, tandis que la platine sera maintenue au même niveau.

Cette remarque a simplement pour but de faciliter le travail, en rendant la mise au point de l'étincelle sur la fente aussi automatique que possible, car ce réglage est la cause d'une grande perte de temps.

Précautions contre les souillures.

Toute souillure, si faible soit-elle, ruine d'un seul coup ce qui fait précisément l'intérêt de la spectrographie, c'est-à-dire sa constance et sa sécurité.

Or, les souillures peuvent intervenir à chaque instant, et lors des phases successives que comportent les opérations précédentes, l'attention doit se porter tout en même temps, sur la préparation et sur les électrodes qui l'étincellent.

Souillures de la coupe.

L'idéal serait de simplifier au maximum la série des manipulations auxquelles elle est soumise. Nous avons insisté déjà sur la nécessité absolue qu'il y a de connaître la composition du fixateur, et l'intérêt évident que l'on trouve à employer les fixateurs organiques (alcool, formol, acide picrique, etc...). Un essai préliminaire du fixateur est donc indispensable, et lèvera tous les doutes. La coupe débitée, est reçue dans l'eau : celle-ci sera distillée car l'eau du robinet fourmille d'impuretés minérales, venues du sol ou des conduites. On n'ira pas,

toutefois, jusqu'à proscrire l'emploi des pinces métalliques dont l'emploi, en milieu neutre, est de toute évidence à l'abri des critiques. Ceci est une question de bon sens.

Les poussières de l'air.

La coupe, une fois placée sur l'électrode inférieure n'est pas à l'abri des souillures extérieures ; celles-ci, flottant dans l'air, viennent, au gré des remous, se déposer sur la préparation, et toute particule minérale, fixée ainsi, traduit sa présence par les raies qui lui sont propres. C'est ainsi que, parfois, dans une série de spectres qui devraient être identiques, on voit tout à coup apparaître une énorme raie du Ca, du Si, du Mg, ou d'autres métaux insolites. Quant au carbone, qui est partout dans l'air, son arrivée intempestive ne peut naturellement être décelée sur une coupe histologique. Contre de telles impuretés, véhiculées par l'atmosphère, il n'y a guère de remède pratique ; on évitera seulement les projections de poussières au voisinage des appareils.

Les impuretés des électrodes.

En réalité, les seules souillures vraiment importantes proviennent des électrodes. Ce sont d'abord les impuretés qui en font partie constitutive. Là encore, un essai préalable est indispensable. Cet essai sera grandement facilité par l'usage d'une table spéciale, conçue par W. et W. *Gerlach* ; ces auteurs, en effet, envisagent les « *épreuves de pureté* » des métaux suivants : platine, iridium, rhodium, aluminium, argent, zinc, plomb, et

se proposent d'en publier prochainement un tableau plus complet. Mais le fait essentiel à retenir, en cette matière, c'est *qu'il est pratiquement très difficile de trouver des métaux spectroscopiquement durs*. C'est pourquoi le *choix des électrodes est guidé par l'analyse en cours*.

Les projections.

A ces impuretés, inhérentes aux électrodes, viennent s'ajouter à leur surface, et du fait même de l'étincelage, des éléments étrangers, projetés par les coupes.

Envisageons d'abord *l'électrode supérieure*. Au bout de quelques instants d'étincelage, elle ne tarde pas à se couvrir d'un givre léger qui la dépolit, et que l'on aperçoit parfaitement dans la loupe déjà décrite. Ce sont les particules arrachées aux tissus que l'on étudie. Si, après quelques examens, on prend un spectre témoin au moyen de cette électrode, on trouve toutes les raies caractéristiques des préparations qui viennent de se succéder ; et dans des examens ultérieurs, ces éléments se retrouveront, même si les nouveaux tissus ne les renferment pas.

Nettoyage des électrodes.

Il est donc nécessaire de nettoyer soigneusement les électrodes ; avec les électrodes métalliques, il suffit d'un lavage énergique avec un acide fort, par exemple l'acide nitrique pour l'or et le platine, suivi d'un essuyage mécanique au papier filtre, et de plusieurs rinçages successifs dans l'eau distillée. Avec les électrodes en

graphite, le nettoyage est plus aisé et plus rapide ; on polit simplement la surface souillée avec un papier filtre sans cendre, qui use facilement tout ce qu'il faut enlever. Il est toujours avantageux de posséder un lot d'électrodes nettoyées d'avance ; elles seront aussi égales que possible, puisque chaque changement d'électrode entraîne une vérification de la mise au point sur la lente.

Il va sans dire que toutes ces recommandations s'appliquent aussi bien à *l'électrode inférieure*. Mais le cas de celle-ci se complique du fait qu'elle est placée sur la platine mobile, qui est en bronze. Lorsqu'une des faces de cette électrode est souillée, on a une tendance irréflechie à la retourner tout simplement, pour utiliser l'autre face, en attendant le nettoyage. Trois cas se présentent couramment :

1° *L'électrode est mouillée d'eau* — à la longue il se forme de l'oxyde de cuivre sur la platine.

2° Après les lavages, *il reste de l'acide nitrique*, qui produit des nitrates de cuivre.

3° *L'électrode est enduite d'acides gras* qui attaquent également la platine.

Ainsi surviennent des raies du cuivre, entièrement parasites.

Voilà, entre beaucoup, un exemple dont la conclusion est évidente : en matière d'analyse spectrale, aucune précaution n'est superflue, et la plus grande attention, la plus parfaite propreté sont de rigueur. Selon l'expression de Policard, il faut réaliser une véritable « *Asepsie chimique* ».

Autres techniques analogues.

Méthode de Walther et Werner Gerlach.

Avant de procéder à l'étude des spectrogrammes, il convient de passer en revue les techniques employées par les auteurs allemands *Walther* et *Werner Gerlach*. Le principe de la méthode qu'ils ont mise au point est le même que celui de la méthode lyonnaise, et ces auteurs arrivent sensiblement aux mêmes résultats. Cependant leur technique est différente par plus d'un point.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, leur procédé dérive de recherches microchimiques exécutées par *Walther Gerlach* et *E. Schweitzer*, et impliquant l'étincelage d'un papier filtre, imbibé de la solution à analyser et d'un électrolyte convenable. La méthode devenue

histochimique a évolué en quelques années, si bien qu'à l'heure actuelle, elle diffère sensiblement de ce qu'elle était au début.

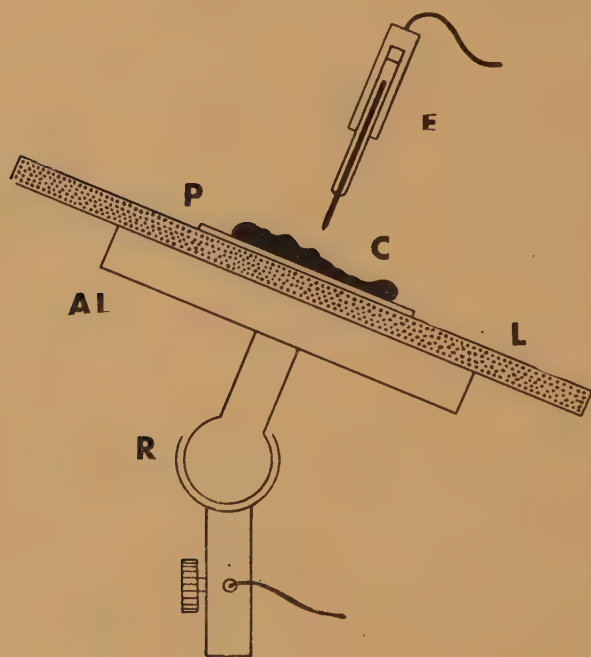


FIG. 6 : Dispositif de W. Gerlach (1933).

- AL : platine d'aluminium, avec sa rotule R.
- L : lame de verre.
- P : papier-filtre humecté.
- C : coupe à examiner.
- E : électrode supérieure.

L'appareillage de ces auteurs comprend un générateur de haute fréquence très puissant et produisant des courants d'une fréquence très élevée (10^6 et plus par seconde). Sa particularité consiste dans le fait qu'un

enroulement de Tesla reçoit le courant de haute tension d'un premier circuit (6 spires) et restitue dans un circuit secondaire (100 spires) un courant de H. F. totalement dépourvu de B. F. Or, dans un tel circuit, le condensateur de faible capacité, constitué par le système support, lame de verre, coupe, n'apporte qu'une très faible gêne au passage du courant.

L'appareil comprend deux électrodes. L'une est une plaque d'aluminium poli, montée sur un support à rotule et inclinable en avant. Elle est reliée au secondaire du Tesla. Sur elle, on place une lame de verre de 0,5 mm. d'épaisseur, qui forme le diélectrique du condensateur déjà nommé. Un peu de glycérine colle cette lame à la plaque d'aluminium. Sur cette lame repose la coupe, portée par une petite feuille de papier filtre de 3 ou 4 cm². L'autre pôle du Tesla est relié à la seconde électrode, ou « contre-électrode » (Gegenelektrode) ; celle-ci est faite d'un métal pur, or ou platine, ayant 0,2 ou 0,3 mm. de diamètre. Elle se trouve à 2 ou 3 mm. au-dessus de la préparation, et peut être orientée en tous sens.

Enfin, et ceci caractérise la technique de Gerlach, le papier filtre est imbibé d'une solution déci-normale de nitrate de soude, et, immédiatement avant la prise du spectrogramme, on dépose sur la préparation elle-même quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Ce sel et cet acide ont pour but de rendre plus conducteur l'ensemble à étudier. Par là même, lorsque le système est bien réglé, l'étincelle demeure suffisamment fixe, et n'a guère de tendance à sauter deci delà sur la coupe. Mais, ajoute Gerlach, « comme la préparation

et le filtre s'échauffent pendant le passage de l'étincelle, durant la prise on ajoute goutte à goutte juste suffisamment de solution à 10 % de nitrate, pour éviter une combustion avec flamme découverte ». Le fait d'imbiber la coupe avec un électrolyte, est une des grosses différences qui existent entre la technique de Gerlach et celle de Policard et Morel.

Cependant, malgré la présence de la lame de verre et les caractères de l'étincelle, on obtient aussi les raies des électrodes ; mais comme leur température reste relativement basse, la quantité de vapeur émise par celles-ci est si faible que l'on ne retrouve dans le spectre que leurs raies les plus fortes, avantage auquel tiennent beaucoup Wa. et We. Gerlach. Pour un ajustement convenable des selfs et des capacités, et avec un accord longuement étudié des circuits entre eux, ces auteurs obtiennent entre 2.000 et 4.000 Å, des spectrogrammes avec le minimum de bandes et le maximum de raies.

Dès le début des recherches effectuées à Bâle et Munich, si l'on en juge par la qualité des spectres obtenus, il apparaît que l'installation des auteurs allemands devait être remarquablement puissante et bien adaptée. Cependant, comme Policard et Morel, ils ont été amenés à augmenter petit à petit l'énergie de leur étincelle. L'appareillage qui vient d'être décrit est le dernier en date, et se trouve avec tous ses détails dans la seconde partie de « Die chemische emissions spektralanalyse » (Leipzig, 1933).

Actuellement, le temps de pose varie de 20 secondes à 60 secondes, alors que, dans les débuts, elle atteignait parfois 5 minutes. Il semble bien que cette augmenta-

tion de l'énergie de l'étincelle ait entraîné dans cette technique d'importantes modifications. En 1931, quand *Wa. Gerlach* et *E. Schweitzer* jetèrent les fondements de la méthode, il était bien spécifié que ni le papier filtre, ni la coupe, ne devaient subir même un début de destruction. Or, dans leur exposé technique, publié le 15 octobre 1932 par la *Dermatologische Wochenschrift*, *Wa.* et *We. Gerlach* sont amenés à déterminer une incinération de la coupe par l'étincelle. Dans leur dernier travail de 1933, ces auteurs s'expriment moins clairement ; ils évitent toujours la combustion du filtre à flamme découverte, mais ils disent simplement : « l'étincelle va et vient entre l'électrode de métal et la préparation, chauffe celle-ci, et amène la vapeur jusqu'à l'incandescence ». Ceci implique bien, semble-t-il, une carbonisation de la coupe, et le phénomène de l'absorption des raies spectrales dans la vapeur incandescente, décrit plus loin, est affirmatif dans le même sens.

La succession des phénomènes est actuellement la suivante. Sous l'influence de l'étincelle, la coupe se dessèche petit à petit, et comme elle a une tendance à se recroqueviller, on la maintient en place avec une mince tige de verre. Bientôt l'étincelle ronge le point qu'elle frappe. On laisse brûler cette zone le plus possible : elle est donc bien détruite. Si l'on ajoute la solution de nitrate de soude, c'est uniquement pour prolonger le temps d'exposition, et intensifier les raies ; car si on ne l'ajoutait pas, le papier filtre desséché à mesure que la coupe se détruit, ne tarderait pas à brûler au grand jour, et la flamme éclairante ainsi produite changerait complètement les caractères du spectre d'étincelle.

Méthode de Walter Benoit.

A la suite des travaux de *Wa.* et *We. Gerlach*, un de leurs élèves, *Walther Benoit*, a poursuivi des recherches qui ont été exposées tout dernièrement dans la « *Zeitschrift für die gesammte experimentelle Medizin* », 1933. Cet auteur utilise l'appareil des précédents, mais sa technique s'éloigne de la leur, et se rapproche plutôt, par le mode d'étincelage, de celle de Policard.

Des coupes ou de petits morceaux d'organes sont portés sur une lame de verre, sans interposition de papier filtre. Le tout est placé sur une platine inclinée et mobile dans tous les sens, construite par la maison Zeiss (Jena). Mais contrairement à *Gerlach*, *W. Benoit* n'ajoute sur sa coupe ni acide chlorhydrique, ni nitrate de soude, pour la rendre conductrice. Ce point est bien spécifié : « il est essentiel, dit-il, que le matériel demeure entièrement non imbibé ». Et il ajoute : « Après l'envoi du courant, un faisceau d'étincelles jaillit sur l'objet, et, sur une étendue d'un mm² environ, amène la coupe à la vaporisation et jusqu'à la carbonisation ».

Il donne ensuite une étude analytique très détaillée des différentes phases de sa technique. Le faisceau d'étincelles (Funkenbüschel) qui jaillit tout d'abord est assez ramassé et présente une couleur jaune provenant du Na vaporisé. Si l'on continue l'étincelage, dans une seconde phase, on voit la gerbe d'étincelles prendre une

couleur bleutée et s'étaler sur la coupe en sautillant. Une « *enveloppe cônica d'étincelles* » (Funkenkegelmantel) est née et s'étend sur le centre carbonisé de la préparation. A mesure que le temps passe, la base de ce cône devient de plus en plus large ; une minute ou deux s'écoulent ainsi, selon le degré d'humidité de la préparation.

Pendant la troisième phase, des étincelles se dégagent de « l'enveloppe cônica » et reviennent vers l'intérieur ; aux endroits où elles frappent se détachent des points très brillants, dont l'un tend petit à petit à prédominer ; ce sont des « *centres de vaporisation* » (Verdampfungscentren) reconnaissables à l'éclat de leur couleur orangée ou verte. A ce moment, les raies Na, Ca, Mg, occasionnellement celles du Cu, sont déjà enregistrées ; de même que les raies 2.500 et 2.890 de la Silice dans les poumons silicotiques.

Enfin, si l'on continue la destruction, l'étincelle se centralise de plus en plus et le centre de vaporisation se fixe ; sa couleur devient très rouge et tout à coup d'un blanc d'argent très vif. A ce moment, tous les éléments minéraux qui peuvent se trouver sur le trajet de l'étincelle sont enregistrés par la plaque ; quatre ou cinq minutes environ se sont écoulées depuis le début des opérations ; mais si la fente du spectroscope est très étroite (1/100 mm.) le temps de pose doit être poussé jusqu'à six minutes.

Le temps capital de cette méthode est le moment où, les centres de vaporisation ayant conflué en un point devenu fixe, ce nouveau centre va s'illuminer vivement et impressionner fortement la plaque. Cette transition

ne dure en général pas longtemps, mais il peut arriver que cette illumination ne se produise pas : l'étincelle s'est creusée dans la coupe une sorte de puits filiforme, et disparaît dans ce « *piège à étincelle* ». La coupe apparaît alors comme un petit morceau de charbon ; quand on la touche avec une baguette de verre, elle donne l'impression d'un objet creux ; et si l'on transperce alors cette écorce calcinée, on a des chances de trouver à l'intérieur le centre de vaporisation disparu. Parfois ce centre ne se forme pas du tout ; on peut alors essayer d'augmenter la distance entre les deux éclateurs, afin d'avoir une étincelle plus grande ; si ce moyen échoue, on a encore la ressource de souffler sur la préparation, de la transpercer avec une petite aiguille de verre, et même de l'insuffler. Il arrive très souvent alors que l'effet désiré se produit.

Comparaison entre ces méthodes et celle de Policard-Morel.

Après avoir décrit les méthodes préconisées par les auteurs allemands, il est intéressant de les comparer à celles de Policard-Morel. Une première différence porte sur la production de l'étincelle. Policard utilise un appareil de H. F. de type commercial, construit en série par la maison Beaudoin ; la coupe est simplement intercalée dans le secondaire, et l'intensité du courant est telle que l'on n'aura jamais à utiliser toute l'énergie disponible. Les spectres obtenus avec cet appareil et le spectrographe de Leiss sont très clairs et ne renferment

qu'un minimum de bandes. Toutefois, il est évident que l'appareillage électrique de Gerlach est beaucoup mieux adapté à ce genre de recherches. Sans même parler de la puissance, la fréquence très élevée du courant qu'il produit, lui permet de vaincre aisément la résistance du système coupe-lame de verre, sans perte appréciable ; enfin le très fort amortissement de son circuit primaire se traduit par la clarté des spectres obtenus, qui sont presque totalement exempts de bandes. Malheureusement, il implique un ajustement très soigné des divers circuits entre eux, ainsi que toute une construction et toute une mise au point qui ne sont pas à la portée de tous les biologistes.

La seconde différence porte sur le support de la coupe. Sur ce point, la technique de Policard constitue une simplification. On admet d'emblée que l'on retrouvera sur le spectrogramme les raies des électrodes : l'électrode inférieure sera faite de la même substance que l'électrode supérieure, et toutes deux seront choisies pour une analyse particulière ; au besoin on répétera l'examen avec d'autres électrodes faites d'un métal différent, et, en tous cas, on prendra un spectre témoin pour chaque plaque.

Les auteurs allemands, eux, s'attachent au contraire à diminuer autant qu'ils le peuvent l'intensité des raies des électrodes, ce qui est possible avec leur appareillage, grâce à la plaque de verre, mais à condition que la température ne soit pas trop élevée. Malheureusement, l'introduction de cette plaque de verre constitue une complication sérieuse ; Gerlach utilise des lames de verre ayant 0,5 mm. d'épaisseur ; « plus cette épais-

seur est mince, dit-il, plus est grande l'intensité disponible de l'étincelle. Pour des épaisseurs de verre supérieures, celle-ci saute facilement tout autour de la lame de verre, même lorsqu'elle dépasse de plusieurs centimètres la platine en aluminium ». Mais les lames plus minces ne supportent pas habituellement l'étincelle, dès qu'elle devient un peu puissante ; W. Benoît conseille même un certain verre résistant « Tempglass de Schott ».

Lorsque la lame de verre a été traversée, les raies de la platine d'aluminium viennent s'inscrire dans le spectre ; c'est du reste pourquoi l'on a choisi ce métal, que l'on trouve facilement assez pur. Au cours de l'examen, l'observateur est averti de cette éventualité par le changement de la fumée et du bruit de l'étincelle, mais il faut recommencer l'examen.

Autrefois, la principale différence entre la technique allemande et la méthode lyonnaise, portait sur la question de la destruction de la coupe. A présent, ainsi que nous l'avons dit, cette différence n'existe plus ; Gerlach carbonise sa coupe, et se contente seulement d'éviter une flamme éclairante ; Benoît, lui, se rapproche franchement du procédé de Policard, et détruit complètement le point de la coupe étincelé jusqu'à la carbonisation. Mais la présence du verre donne à cette destruction une allure caractéristique. Gerlach mouille sa coupe pour la rendre conductrice, et par ce moyen obtient une étincelle relativement fixe ; cette fixité est malgré tout sous la dépendance de plusieurs facteurs : l'épaisseur de la plaque de verre, l'intensité du courant, et tout un réglage de l'appareil. Walther Benoît a renoncé au papier filtre imbibé d'un électrolyte ; mais il

n'est plus maître de son étincelle, qui saute de ci de là sur la coupe, ne se localise qu'à la fin, où elle veut, et même pas toujours. Tout le premier temps de l'étincelage, pendant lequel s'enregistrent en particulier Na, Ca, Mg, Cu et la silice à l'état libre, se passe à poursuivre les « *centres de vaporisation* » qui se meuvent sur la coupe. Il faut même, paraît-il, un certain exercice pour projeter, grâce au jeu des pignons, l'image de ces points toujours à la même hauteur de la fente. Mais lorsqu'on arrive au deuxième temps de la prise du spectrogramme, la difficulté est double, car il faut alors surveiller tout en même temps la projection du centre lumineux sur la fente, et la venue de ce centre sur la coupe. Dans ces conditions, il est bien difficile d'admettre qu'une technique si pleine d'imprévus, reposant sur une étincelle aussi peu fixe, permette une localisation précise sur la coupe, ou un repérage histologique préalable. A la vérité, il ne semble pas jusqu'ici que les auteurs allemands, au contraire de Policard, aient attaché une importance capitale à cette localisation de l'étincelle.

Dans la méthode lyonnaise, au contraire, du fait que l'électrode inférieure est placée directement sur la platine, l'étincelle se trouve parfaitement immobile et automatiquement fixe. On a tout le loisir de choisir le point intéressant, d'y localiser l'étincelle, de surveiller sa destruction, et d'arrêter l'enregistrement spectral en temps voulu. Ce caractère de fixité, d'automatisme des opérations, est le principal avantage de cette technique; grâce à lui, elle est devenue une méthode vraiment histologique.

Étude des spectrogrammes. Données qualitatives.

Mode d'examen des spectrogrammes.

Chaque spectrogramme comprend six à dix spectres dont il s'agit de dépouiller les raies. Le cliché obtenu est un négatif, c'est-à-dire que les raies, brillantes dans la réalité, apparaissent en noir sur la plaque ; il est cependant inutile d'en tirer un positif, car il est impossible de traduire par une seconde manipulation photographique, la finesse des détails et toute la gradation des demi-teintes présentées par l'original. On peut utiliser deux modes d'examen. Le plus simple ne nécessite qu'une loupe. Un autre procédé plus précis, et moins fatigant, mais plus compliqué, implique l'emploi d'un appareil spécial dit « *comparateur* ».

Etude à la loupe des clichés.

Les clichés sont disposés, gélatine en avant, sur un support translucide analogue à un pupitre à retouche, et on les examine au moyen d'une loupe aplanétique grossissant 5 ou 6 fois. L'éclairage du jour, tamisé par un verre dépoli, est le plus favorable pour la recherche des raies très faibles, car la lumière artificielle directe provoque un scintillement très gênant au sein de la gélatine ; le soir on utilisera donc la lumière d'une ampoule opaline, réfléchiée et diffusée par un buvard blanc.

Parmi les nombreuses raies que présente le spectre, le premier travail est de reconnaître celles qui appartiennent aux électrodes, et leur donner leur longueur d'onde.

Pour faciliter ce travail, on aura constitué par avance un lot de spectres de référence, enregistrés avec des électrodes de différentes natures, sans coupe interposée; sur ces spectres de référence, les raies principales sont notées avec un petit trait d'encre, et leur longueur d'onde marquée en regard. On consultera à cet effet des tables spéciales, comme celles de *Kayser* ou l'atlas de *Löwe*.

On fait coïncider exactement les raies du spectre de référence avec les raies correspondantes du spectrogramme étudié. On peut alors, assez facilement en général, trouver les raies de ce dernier qui n'ont pas leurs correspondantes dans le spectre de référence. De cette manière, les raies des électrodes non seulement ne cons-

tituent pas une gêne pour la lecture, mais encore si elles ne sont vraiment pas trop nombreuses, font l'office d'une échelle rigoureusement précise, permettant de situer les raies apportées par la coupe. Pour effectuer un numérotage, on s'aide également d'une échelle sur verre, obtenue photographiquement, et livrée par le constructeur avec chaque spectrographe. Ayant ainsi déterminé la longueur d'onde de ces raies particulières, il sera aisé, au moyen des tables nommées plus haut, de trouver à quel élément elles correspondent.

On ne tardera pas à s'apercevoir que cette technique, évidemment simple puisqu'elle ne nécessite qu'une loupe, est assez pénible. Les raies sont très nombreuses, et dans le proche ultra-violet, constituent une véritable forêt, où il est difficile, dans ces conditions, de distinguer des longueurs d'onde à moins de 10 Å près. Aussi, à ce procédé rudimentaire et pénible, on peut avantageusement en substituer un autre, nécessitant un appareil spécial.

Emploi des comparateurs optiques.

1° Les appareils.

Le moyen classique de comparer des spectrogrammes en vue d'identifier leurs raies est d'utiliser une machine à mesurer spéciale, avec platine à déplacements rectangulaires, vis micrométrique et microscope.

Cette machine permet d'effectuer les repérages avec une grande précision. Mais son emploi a trois incon-

vénients : prix élevé de l'appareil, impossibilité de démontrer les spectres à plusieurs observateurs, fatigue oculaire de son utilisation.

Au contraire, avec les appareils dits « *comparateurs optiques* » ou « *comparateurs de spectres* », l'étude des spectrogrammes est d'une extrême commodité et peut être pratiquée simultanément par plusieurs observateurs. Le comparateur optique de *Beaudoin* (Paris) repose sur le principe de la lanterne de projection. A l'avant d'une sorte de caisse, et contre l'opérateur, est une source lumineuse, qui éclaire un cadre vertical à glissières, mobile en hauteur et en largeur. Sur ce cadre, on fixe le cliché qui se projette, grâce à un objectif approprié, vers le fond de la caisse. Là, son image est reçue sur un miroir argenté, qui la renvoie vers l'avant sous les yeux du spectateur. Elle se forme, agrandie huit fois, sur un verre dépoli, incliné comme un pupitre.

Cet appareil n'est, du reste, pas le seul du genre ; entre autres, un comparateur de spectres a été construit et décrit par G. Lasègue et Mlle Th. Collin (Bull. Soc. Chim., T. 47, p. 910, 1930). Cet appareil, aisément réalisable, projette des spectres agrandis quinze fois sur une table horizontale. Son maniement est analogue à celui de *Beaudoin*, à quelques détails près.

2° *Reconnaissance des raies.*

Voici comment on opère au moyen du « comparateur de *Beaudoin* ». On projette tout d'abord un spectre de référence, avec les raies des électrodes seules comme

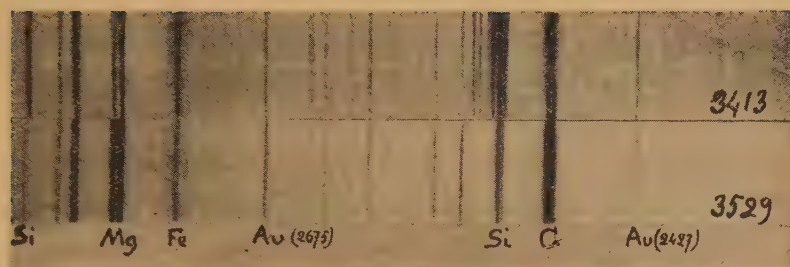


FIG. 7 : Présence de l'or dans la région médullaire du rein (3413) et dans le foie (3529) d'un malade ayant subi la chrysothérapie.

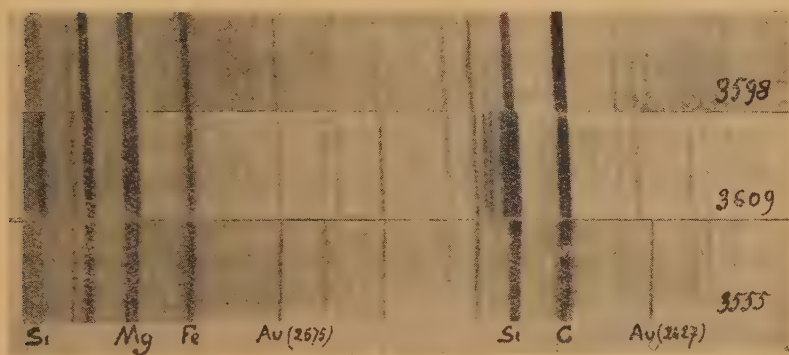


FIG. 8 : Présence de l'or dans l'écorce rénale de cobayes ayant reçu de la sanocrysine.

Ces spectres apparaissent comme ils sont vus au comparateur de Beaudoin.

précédemment. Sur une bande de papier translucide, on en repère les raies caractéristiques, que l'on affecte de leur longueur d'onde. A ce moment, les recherches peuvent s'effectuer dans deux sens : a) recherche d'un élément donné dans les spectrogrammes d'un tissu ; b) analyse de toutes les raies d'un spectrogramme.

Recherche d'un élément particulier. — On aura tiré au préalable un spectre de cet élément, que l'on projette sur le verre dépoli comme on l'avait fait pour les raies intéressantes et en particulier les « *raies ultimes* » de l'élément en cause. On peut même les numérotter, en se servant des tables, et figurer l'intensité des raies par un trait plus épais ou par tout autre signe conventionnel. Il est même facile d'établir ainsi à l'avance des bandes étalonnées pour chaque métal. Etant donné le grossissement, il est inutile d'enregistrer ces étalons par la voie photographique : la précision est très suffisante si on les dessine tout simplement.

On projette enfin le spectrogramme à l'étude sur le verre dépoli du comparateur. Les raies des électrodes servent de repère pour placer l'étincelle étalonnée, et on cherche alors si l'on trouve, sur le spectrogramme, les raies de l'élément recherché. La technique ainsi résumée, est d'une grande simplicité, et d'une sécurité absolue.

Analyse de toutes les raies du spectrogramme. — Ici, le problème est posé comme en spectranalyse chimique, ou en spectrographie astronomique, et la solution de ce problème implique la détermination exacte

de chacune des raies offerte dans l'échelle des longueurs d'onde. C'est là une opération courante en spectrographie, mais beaucoup plus longue et plus sujette à erreurs que la recherche d'un élément donné. On s'en rendra bien compte par l'étude des raies, qui sera faite ultérieurement. En premier lieu, il faut partir d'une échelle de longueur d'ondes correctement établie. Parfois, en projetant celle qu'a livrée le constructeur du spectrographe, on s'aperçoit, grâce au fort grossissement, que cette échelle, exacte au milieu, cesse de l'être lorsqu'on arrive aux deux extrémités du spectre.

Ce défaut traduit les difficultés que l'on rencontre industriellement pour fabriquer des prismes exactement semblables entre eux. Pour cette raison, il est préférable d'établir son échelle soi-même, au moyen d'un bon spectre de référence, où les raies auront un « *piqué* » particulièrement fin. Comme métal, l'or ou le fer sont très commodes. L'emplacement de chaque raie est déterminé avec précision au moyen d'un vernier sur une règle métrique. Sur un papier quadrillé au millimètre, on porte en abscisses les chiffres ainsi trouvés, et en ordonnées les longueurs d'ondes, exprimées en U Angström, et données par la table de Kayser. On trace alors une courbe, grâce à laquelle l'échelle des longueurs d'ondes est établie avec précision. Cette échelle est en fin de compte gravée sur une bande de parchemin végétal, ou de « *rhodoïd* » translucide.

Pour l'utilisation de cette échelle, on prend comme point de repère sur le spectre étudié une raie bien caractéristique (par exemple : la raie du carbone : 2478 ; ou les raies de l'or : 2425 et 2676 ; ou du magnésium : 2795-

2802-2832). L'échelle est fixée en regard, sur le verre dépoli du comparateur, au moyen du papier adhésif déjà décrit. Il est alors facile de déterminer les longueurs des diverses raies à reconnaître. Dès qu'un certain nombre d'éléments ont été trouvés avec certitude, on coche toutes les raies qu'ils sont susceptibles d'émettre, et la lecture des autres raies devient plus facile d'autant.

Étude des raies.

Les raies des électrodes.

Parmi les raies du cliché, un certain nombre appartiennent aux électrodes ; on admettra d'emblée leur présence puisqu'on ne peut les empêcher complètement. Ainsi qu'il a été dit, l'électrode supérieure filiforme et l'électrode inférieure plate, qui supporte la coupe, seront faites de la même substance : ceci est évident. On a vu précédemment que cette substance devait être choisie avec soin pour chaque analyse en cours.

La présence des raies des électrodes dans un spectre est presque toujours un *inconvenient*. Lorsque ce spectre est particulièrement riche en raies, si, par exemple, il contient du fer en abondance, l'emploi d'une électrode comme le platine est nettement contre-indiqué ; car

sans parler des impuretés contenues dans ce métal. le spectre deviendrait un vrai maquis ; c'est l'or qui, dans ce cas, servira d'électrode : la lecture est alors très facile. Il est tout à fait exceptionnel que l'on trouve une coïncidence entre une raie principale de l'électrode et une raie de grande sensibilité d'un élément que l'on recherche.

La présence des impuretés contenues dans les électrodes est un inconvénient plus sérieux, qu'un choix judicieux de ces électrodes éliminera. En pratique, on peut avantageusement suivre les règles suivantes :

— Quand on veut rechercher des métaux tels que Au, Ag, Cu, Sb, Bi, etc... ainsi qu'un certain nombre de métaux lourds, il est bon de prendre des électrodes de *graphite*, lequel ne fournit que des raies bien nettes et peu nombreuses.

— Si l'on veut rechercher Fe, Mg, Ca, Si, K, Na, etc..., le graphite est inutilisable et l'or « *vierge* » est l'électrode de choix.

— Enfin le *cuivre* pur, et l'*aluminium*, serviront très souvent lorsqu'on ne travaillera pas à une température trop élevée.

Un moyen classique d'affaiblir le spectre de ces éléments parasites et celui des électrodes elles-mêmes, est d'éviter un trop grand échauffement de ces électrodes, et de diminuer le temps de pose. Ce moyen est difficile à employer pour des recherches histologiques, car alors le temps de pose est avant tout réglé par la destruction de la coupe. C'est grand dommage, car lorsqu'une raie des électrodes se trouve immédiatement à côté d'une

raie ultime d'un élément cherché, on éprouve parfois une certaine difficulté à caractériser celle-ci, lorsque la raie de l'électrode est très intense.

En revanche, il convient de dire que les raies des électrodes, lorsqu'elles ne sont pas trop intenses, facilitent le plus souvent la lecture des spectrogrammes, Elles permettent une orientation rapide au milieu des autres raies et jouent ainsi le rôle d'une échelle qui serait graduée avec une précision absolue. Dans tous les cas, un spectre témoin des électrodes seules, sera enregistré au début de chaque examen, et sur toutes les plaques ; c'est la manière la plus sûre d'éviter les erreurs dûes aux impuretés des électrodes.

Le spectrographe doit être ainsi considéré comme instrument très précis, mais à la manière d'une balance qui serait non pas « *juste* » mais « *sensible* ». Le spectre témoin est, si l'on peut dire, sa « *double pesée* » : il faut accepter d'emblée cette nécessité.

Raies et bandes de l'air.

En plus des raies des électrodes et de la coupe, les spectrogrammes montrent des raies appartenant à l'air, ce qui est tout naturel, puisque l'étincelle jaillit librement dans l'atmosphère. Il sortirait des limites de ce travail d'exposer les caractères des spectres d'un gaz incandescent, et l'origine de ce qu'on appelle les « *bandes* » de l'air.

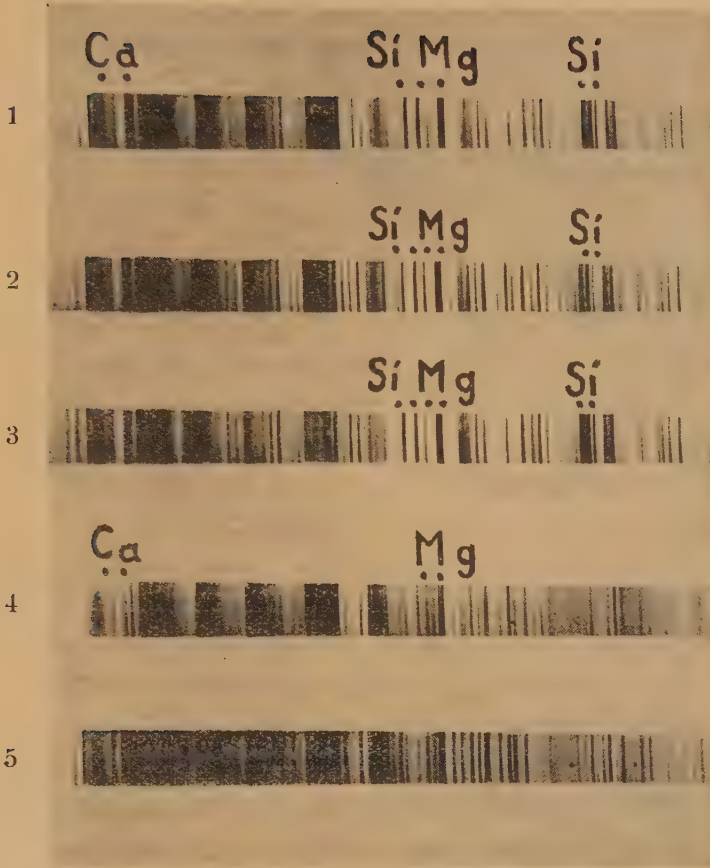


FIG. 9 : Spectrogramme d'une silico-tuberculose pulmonaire.

1, 2 et 3 : nodules silico-anthracosiques.

4 : nodule caséeux.

5 : spectre témoin : électrodes en platine.

On voit, à gauche, les bandes de l'air.

Disons, en gros, qu'elles consistent en séries de surfaces sombres, plus ou moins larges, qui viennent assombrir les négatifs de place en place, et d'une façon plus ou moins régulière. Des spectrographes très dispersifs, ayant une fente très étroite, arrivent à les décomposer en une multitude de petites raies très fines, et régulièrement espacées. Elles proviennent des gaz de l'air, surtout de l'azote, de la vapeur d'eau, et aussi des combinaisons qui ont lieu entre les gaz de l'atmosphère et la vapeur incandescente où jaillit l'étincelle.

La présence, l'intensité et l'emplacement de ces bandes varient considérablement avec l'agent physique qui sert à détruire la substance analysée. L'arc de basse tension, continu ou interrompu, n'en présente que fort peu. L'étincelle condensée, au contraire, en fait apparaître de très fortes ; mais lorsqu'on intercale dans le circuit de cette étincelle des selfs convenables, le spectre parasite de ces bandes sera éliminé peu à peu. Ceci provient du fait que la décharge initiale de l'étincelle est due aux ions préexistant dans l'air ; l'un des effets de la self-induction est d'affaiblir la décharge initiale, et par conséquent le spectre de l'air.

A ce point de vue, l'emploi de l'*étincelle de haute fréquence* est particulièrement avantageux, et son spectre est toujours plus semblable à celui de l'arc qu'à celui de l'étincelle condensée. Mais ce qui a été dit de la self-induction pour celle-ci, reste vrai pour l'étincelle de H. F. ; les bandes diminuent beaucoup avec une self convenable, mais réapparaissent si l'on shunte trop fortement le secondaire. Toutes choses égales d'ailleurs, ces bandes sont plus accentuées si la fréquence est *peu éle-*

vée ; mais elles disparaissent au maximum lorsque les oscillations sont très « *amorties* » et presque « *éteintes* ». Leur intensité n'est plus gouvernée alors que par les substances en jeu et leur tension de vapeur.

Mais comme la décharge de haute fréquence, surtout dans les recherches biologiques, est très irrégulière, et comme la nature des électrodes et la quantité relative des substances de la coupe sont tout aussi variables, cette étincelle fait apparaître les bandes de l'air avec une intensité que l'on ne peut prévoir à l'avance ; et lorsqu'on voudra percer ces bandes, leur interprétation devra faire l'objet d'une discrimination très soigneuse. Fort heureusement, elles se trouvent en général dans le grand ultra-violet, c'est-à-dire à l'endroit le moins intéressant du spectre ; en tous cas, avec un bon générateur de H. F., elles ne gênent guère avant 3.000 Å.

Les raies de la coupe.

Pour l'identification des éléments minéraux contenus dans la coupe, on a un grand intérêt à utiliser les raies situées dans le court ultra-violet, et ceci pour deux raisons. Tout d'abord, à mesure que l'on s'éloigne du spectre visible, les raies sont de plus en plus « étalées » et distantes les unes des autres. Ainsi, en utilisant le spectrographe de Leiss, modèle C, la dispersion est de 8 Å par millimètre, dans la région de 2.500; 13 Å vers 3.000; et 20 Å déjà à 3.500. Les mesures sont donc bien plus précises et plus aisées dans les courtes longueurs d'onde;

les raies y sont du reste bien moins nombreuses. En second lieu, le proche ultra-violet est fortement assombri par les bandes de l'air, qui sont sensibles à partir de 3000

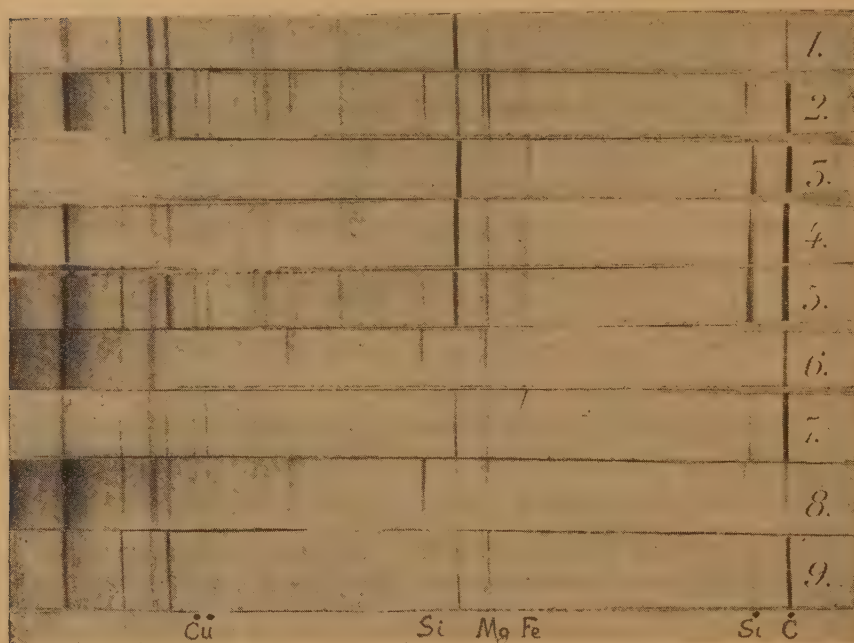


FIG. 10 : Détection du cuivre dans divers foies.

- 1 : Spectre témoin des électrodes en graphite seules.
- 2 : Foie de fœtus.
- 3 : Foie de sujet normal (traces de Cu).
- 4 et 5 : Cirrhoses atrophiques.
- 6, 7, 8 et 9 : Cirrhoses pigmentaires (Mallory-Parker).

À ; on n'arrive pas toujours à les affaiblir en diminuant la pose ; si l'on ne possède pas un spectrographe assez dispersif, elles causent facilement de graves erreurs.

En histospectrographie, les quantités de substance sont en général très faibles ; pour identifier un élément, il est nécessaire d'utiliser les raies dites « de *grande sensibilité* » et les « *raies ultimes* » (A. de Gramont), c'est-à-dire les raies qui sont les dernières à disparaître lorsque la quantité de l'élément diminue progressivement. Ces raies sont celles qui résistent à l'introduction d'une self. Elles sont les plus persistantes, mais pas nécessairement les plus intenses dans le spectre complet.

Lors de l'identification des raies de grande sensibilité, on peut être gêné par toute une série de phénomènes. La source lumineuse elle-même est le siège d'une « *absorption* » des raies spectrales par la vapeur incandescente, dans laquelle un élément peut absorber les propres raies qu'il émet ; l'on assiste ainsi à un « *renversement* » des raies du spectre ; (découverte de Bunsen et Kirschhoff — raies de Fraunhofer) ; de sorte que plus un élément est abondant, plus sa raie s'affaiblit : il arrive même qu'elle disparaît. Par ailleurs, de deux raies très voisines, appartenant à des corps différents, celle du corps le moins abondant est parfois affaiblie dans de très fortes proportions : cette radiation subit ainsi une sorte d'emprisonnement dans la source lumineuse.

Heureusement, ces deux phénomènes, surtout le premier, sont peu marqués en spectranalyse histologique, grâce à l'emploi de l'étincelle de haute fréquence, et surtout grâce aux faibles quantités de substances mises en jeu. On est bien plus gêné dans la lecture par les coïncidences, ou tout au moins les voisinages rapprochés des raies de substances différentes.

Il est nécessaire d'être bien prévenu des causes d'erreurs qui proviennent de ces coïncidences. On en trouvera ci-après un tableau, où les raies de grande sensibilité et les raies ultimes des divers éléments sont également portées. Ce tableau est extrait des travaux de A. de Gramont (1923) et de W. Gerlach (1933). Les raies ultimes sont étudiées par ordre d'apparition : u 1 est la première à se manifester ; viennent ensuite u 2, u 3, etc.. Les longueurs d'onde sont presque toutes tirées de la table de Kayser.

Ag. Argent

Raies de grande sensibilité : 2437,7

Raies ultimes : 3383, 3280,7 (u 1)

Coïncidences : Le doublet 3383 et 3280,7 n'est jamais absorbé par un autre élément ; mais une forte bande peut gêner l'appréciation de ces raies ; employer alors une fente très fine et un appareil très dispersif.

Non loin de la raie Ag 3280,7, se trouve la raie du Zinc : Zn 3282,3, qui peut se confondre avec elle lorsque ces deux éléments sont très abondants. L'ensemble des deux apparaît comme une double raie, ou bien une ligne épaisse.

Al. Aluminium

R. g. s. : 3092,7 3082,1 2652,4 2575,1

R. U. : 3961,5 3944

Coïncidences : Le doublet de l'Aluminium 3944 3961,5 se trouve au milieu du doublet du Calcium 3968,5 3933,7. Attention à une bande très diffuse en 3934.

La raie 2575 est très voisine du Manganèse 2576, voir alors si la raie Al 2652 est présente.

As. Arsenic

R. g. s. : 2860,4 2745 2288,1

R. U. : 2780,2 2349,8 (u 1)

Co. : Le Béryllium a une raie en 2348,6 ; il faut la distinguer de la raie As : 2349,8 qui est la plus sensible de l'Arsenic. La seconde raie sensible As : 2288,1 ne peut être distinguée de Cd : 2288,0. La troisième raie sensible As : 2780,2 ne peut être utilisée parce qu'elle se confond dans les préparations avec celle du Magnésium, Mg : 2779,9 qui est toujours présent dans les coupes.

Au. Or

R. g. s. : 2802,2

R. U. : 2675,9 2427,9

Co. : La raie du Plomb Pb : 2669,2 est voisine de Au : 2675,9. La raie Au : 2802,2 est commune avec Mg : 2802,7 et Pb : 2802.

Ba. Baryum

R. g. s. : 3891,7 2335,2

R. U. : 4934 4554 (u 1) (dans le spectre visible)

Bi. Bismuth

R. g. s. : 2989 2938,3 2780,5

R. U. : 3067,7 (u 1) 2897,9

Co. : La ligne la plus sensible : *Bi* : 3067,7, tombe sur le sommet d'une double bande. La raie du fer : 3067,8 peut l'atténuer lorsqu'il y a peu de bismuth ; employer une fente très étroite. La raie 2898 est un peu moins sensible ; mais *Fe* : 2899,4, lorsqu'elle est très forte, peut la couvrir.

C. Carbone

R. g. s. : 4267,1 2296,8

R. U. : 2478,6

La raie 2478,6 est très caractéristique. On la trouve sur toutes les coupes.

Ca. Calcium

R. U. : 4226,7 (u 3) 3968,4 (u 2)

3933,6 (u 1)

A signaler un doublet : 3158,8 et 3179,3.

Cd. Cadmium

R. g. s. : 3610,5 3261 2748,6 2144,3

R. U. : 2288 2265 (u 1)

Co. : La raie ultime, avant-dernière à disparaître. *Cd* : 2288 est inutilisable en présence d'Arsenic : *As* : 2288,1 ; si l'autre ligne *As* : 2349,8 est présente, la constatation de 2288,0 n'est plus une preuve de la présence du Cadmium.

Il est donc difficile de déceler des traces de cadmium ; lorsque les quantités de ce métal sont un peu plus fortes, on voit apparaître *Cd* : 3261,1. Mais alors cette

ligne peut se confondre avec celle du Zinc, Zn : 3262,3, qui est la plus sensible (voir alors la raie Zn : 2863,3).

La ligne très sensible Cd : 3610,5 peut être absorbée par celle du Fer 3610,1. Avec des plaques sensibilisées, la plus sensible de toutes est Cd : 2144,3

Co. Cobalt

R. g. s. : 4121,3 3609,6 3634,7

La raie 4121,3 peut distinguer le Cobalt parmi tous les autres éléments. Les deux raies suivantes sont également très sensibles ; mais elles sont souvent couvertes par une bande, et ne peuvent servir qu'au contrôle de la précédente.

Cr. Chrome

R. g. s. : 4289,7 4274,8 3578,6

R. U. : 4254,3 3605,3 3593,4

Cu. Cuivre

R. U. : 3274 3247,5 (u 1)

Ces deux raies constituent un doublet d'une extrême sensibilité, qui malheureusement se trouve à proximité d'une forte bande ; on diminuera le temps de pose au maximum pour affaiblir cette bande.

Fe. Fer

R. g. s. : 3820,4 3737,1 3735,3

3570 3565,5

R. U. : 2755,7 2749,3 2739,5

2395,6 (u 2) 2382 (u 1)

Les raies du Fer dans l'ultra-violet sont innombrables ; on se référera aux raies ultimes ; la raie 3021 est également très facile à trouver, mais elle est située à proximité d'une bande.

Ga. Gallium

R. U. : 4172,1 4033 (u 1)

Co. : La ligne très sensible du Gallium : Ga : 4172,1 est toujours libre. La suivante, Ga : 4033, coïncide avec la raie 4033,1 du Manganèse (chercher alors l'autre raie 4030 du Mn, si la dispersion est suffisante). En l'absence du Manganèse, la raie Ga : 4033 peut être considérée comme la plus sensible. Dans le cas contraire, on ne peut affirmer le Gallium que si la raie 4033 est plus forte que 4030.

Hg. Mercure

R. g. s. : 4358,3

R. U. : 2967 2536,5 (u 1)

Co. : La ligne la plus sensible du Mercure, Hg : 2536,5, est à distinguer soigneusement de la très forte raie 2536,4 du Phosphore et de la faible raie du Fer, Fe : 2537,2.

Les raies Hg : 1869,4 et 1820,8, qui se trouvent dans l'extrême ultra-violet, sont très sûres, mais inaccessibles avec des plaques non sensibilisées.

K. Potassium

R. g. s. : 3447,3 3446,3

R. U. : 4047,2 (u 1) 4044,1

Les raies 3446 et 3447 sont de faible intensité. La raie 4044,1 est peu intense également, mais très commode.

Li. Lithium

R. g. s. : 3232,6

R. U. : 4602

Mg. Magnésium

R. g. s. : 3838,2 3832,3

R. U. : 2852,1 (u 1) 2802,7 (u 2) 2795,5 (u 3)

Les raies 2795,5 et 2802,7 constituent un doublet facile à reconnaître. Il en est de même des raies 3832,3 et 3838,2. On trouve cet élément dans presque toutes les préparations.

Mn. Manganèse

R. g. s. : 4034,4 4033 2605,7

R. U. : 4030,8 (u 2) 2593,7 (u 3) 2576,1 (u 1)

Co. : La raie Mn : 2576,1, qui est la plus sensible, peut être confondue avec la raie 2575,1 de l'Aluminium (chercher alors Al : 3082,1 et 3092,7). Les raies suivantes Mn : 2593,7 et 2605,7 sont un peu moins sensibles ; elles sont facilement absorbées par les raies du Fer, Fe : 2593,8 et 2606 à 2607. D'autre part, les raies Mn : 2798,3 et 2801,1 sont inutilisables dans le matériel organique, où l'on trouve constamment les raies du Magnésium Mg : 2798,2 et 2802,7.

Na. Sodium

R. g. s. : 2852,8

R. U. : 3302,9 3302,3

Co. : Comme toutes les préparations contiennent cet élément en abondance, on ne le recherche pas, mais on l'identifie pour le distinguer d'autres raies. Les raies ultimes 3302,9 et 3302,3 sont couvertes par une bande de l'azote. La raie 2852,8 est confondue avec la raie du Magnésium : Mg : 2852,1.

P. Phosphore

R. g. s. : 2555,1 2534

R. U. : 2553,3 2535,7 (u 1)

Co. : Lorsque le matériel contient peu de phosphore, mais beaucoup de fer, la ligne la plus sensible P : 2535,7 est couverte par Fe : 2535,6.

Au voisinage des raies ultimes du Phosphore, se trouve une raie du Mercure : 2536,5.

Les raies du Phosphore P : 2136,1 et 2149,8 sont les plus sensibles de toutes celles du Phosphore lorsqu'on utilise des plaques sensibilisées.

Pb. Plomb

R. g. s. : 3639,5 2614,2 2203,5 2175,6

R. U. : 4057,8 (u 1) 3683,5

Co. : L'identification de la raie la plus sensible Pb : 4057,8 exige un prisme de verre, car elle est couverte par une bande de l'air. Les raies Pb : 3639,5 et 3683,5 peuvent être recouvertes ou absorbées par les raies du

Fer, Fe : 3640,4, 3683,1 et 3684,1. Chercher alors les autres raies du fer.

Pt. [°] Platine

<i>R. g. s. :</i>	3922,8	3268,4	3064,7
	2997,9	2659,4	
<i>R. U. :</i>	3966,4		

Co. : Les traces les plus faibles de Platine se traduisent par la raie ultime Pt : 3966,4. Mais elle peut être masquée par la raie du Calcium Ca : 3968,5.

Sb. Antimoine

<i>R. g. s. :</i>	3267,4	3232,5	2311,5
<i>R. U. :</i>	2598,1	2528,5	

Co. : Les deux raies ultimes Sb : 2598,1 et 2528,5 peuvent être masquées par les raies Fe : 2598,4 et Si : 2528,5. Dans ce dernier cas, si l'on doute, on recherche une autre ligne de la silice : Si : 2516 ; si elle manque, ou si elle est très faible, on peut affirmer l'Antimoine.

Si. Silicium

<i>R. g. s. :</i>	3905,5	2514,3	2506,9
<i>R. U. :</i>	2881,6 (u 1)	2516,1	

Co. : Les deux raies ultimes sont également les plus intenses et se distinguent facilement. Lorsque la quantité de Si est assez grande, on voit apparaître toute une série de raies entre 2507 et 2528, dont quelques-unes se confondent avec celles du Fer, mais jamais la raie ultime 2516,1.

Sn. Etain

R. g. s. : 3801 3330,6 3175 2839,9
 2706,5

R. U. : 3262,3 2863,3

Co. : La raie ultime 3262,3 est absorbée par Cd : 3261,1.

La raie Sn : 2863,3 peut être couverte par celles du Fer, Fe : 2863,4 et 2863,9.

Sr. Strontium

R. g. s. : 4305,4

R. U. : 4607,3 4215,5 (u 2) 4077,7 (u 1)

Tl. Thallium

R. g. s. : 3519,2 3229,7 2767,8

R. U. : 3775,7

Co. : La raie ultime du Thallium Tl : 3775,7 se trouve dans une bande ; mais elle est reconnaissable si l'on dispose d'une grande dispersion

Zn. Zinc

R. g. s. : 4680,1 3303,3 2138,5

R. U. : 4810,5 4722,1 3345,5

Co. : La raie 3345,5, lorsque la quantité de Zn est très faible, se perd au milieu d'une bande. Elle est facilement couverte par celle du Calcium, Ca : 3344,5. Il en est de même de la raie 3303,3 vis-à-vis du Sodium, Na : 3303,0.

Cependant, malgré les bandes, le Zinc se reconnaît toujours par le triplet 4680,7, 4722,1 et 4810,5.

Données quantitatives.

L'intérêt d'une histochimie quantitative n'échappera à personne. La chimie biologique ne possédait jusqu'à ces dernières années qu'un petit nombre de techniques reposant sur des méthodes colorimétriques ou pondérales, s'adressant soit à des organes considérés globalement, soit à des fragments d'organes prélevés par une microdissection attentive.

La spectrographie biologique permettant une localisation précise de l'investigation, il était désirable qu'une telle méthode devînt quantitative ; l'histospectrographie a suivi les progrès de la spectranalyse quantitative ordinaire, où de nombreuses recherches dans cette direction ont été faites depuis quelques années, et sont encore en cours. Les premières en date sont celles de Lockyer, 1873, Hartley, 1884 et de Gramont, 1894.

Dans le chapitre qui va suivre, nous exposerons simplement le principe de ces nouvelles méthodes dans leur

rapport avec l'histologie. Nous n'avons pas encore, personnellement, faute de matériel, travaillé avec précision dans ce sens ; ces lignes sont donc la synthèse de publications parues en France ou à l'étranger.

Fondements de ces méthodes.

Le problème est celui-ci : étant donnée une quantité de matériel à analyser, il s'agit de déterminer le pourcentage d'un élément dans ce matériel. Or, lorsque dans un mélange on diminue graduellement le taux d'un élément, le spectre se modifie de deux façons : il devient de plus en plus pauvre en raies de cet élément, et ces raies deviennent de plus en plus faibles. A un moment, on ne trouve plus sur le spectre que ses « *raies ultimes* » et ces raies à leur tour s'affaiblissent et disparaissent. De sorte que pour mesurer le taux d'un corps dans un mélange, on dispose de deux facteurs : la présence ou l'absence de certaines de ses raies, et l'intensité des raies émises par ce corps.

Appréciation par les « Raies Ultimes ».

Ainsi que nous l'avons vu, les *raies ultimes* sont les dernières qui persistent lorsque diminue le taux d'un élément ; ce sont elles qu'il faut rechercher tout d'abord pour caractériser un corps en faible proportion. A. de Gramont a montré que l'apparition et la dispari-

tion des raies d'un corps, suivant sa teneur, obéit à une sorte de rythme, et que, de l'étude de ce rythme, on peut tirer des conclusions sur la teneur au moins approximative de l'élément en cause dans le mélange.

Or, la présence ou l'absence des raies d'un spectre dépend aussi d'une quantité de facteurs accessoires, et, en particulier, de la nature du mode de destruction ; il y a des différences notables entre un spectre d'arc, un spectre d'étincelle, un spectre de flamme, et un spectre de haute fréquence. L'ordre de disparition des raies varie également avec cette nature, mais aussi avec la présence de tels ou tels minéraux, et la proximité d'autres raies. Il est donc difficile de donner *a priori* une relation numérique du phénomène ; mais, lorsqu'on aura rendu bien fixes les caractères de l'appareillage, on établira, au moyen d'étalons, l'ordre de disparition des raies. Là, comme ailleurs, il importe de s'en tenir à un seul appareillage, une fois qu'il sera mis au point.

On s'aperçoit alors que l'apparition et la disparition des raies se fait en quelque sorte par paliers successifs. Les spectres très riches, comme celui du fer, par exemple, peuvent se décomposer en série de raies qui apparaissent et disparaissent à peu près en même temps. De sorte qu'on peut se faire assez rapidement une idée de la quantité de cet élément dans une préparation (à condition, bien entendu, que l'étincelle soit assez énergique pour le libérer dans sa totalité).

Appréciation de l'intensité des raies.

Hartley et de Gramont ont montré que l'intensité des raies spectrales d'un élément diminue à mesure que la

teneur de cet élément devient plus faible dans un mélange ; on pourrait par ce moyen rendre plus précises les approximations fournies par l'examen des raies ultimes. Il s'agit là, en somme, de remplacer *par l'appréciation de quantités de lumière*, les *données pondérales* de la chimie ordinaire. Ces quantités de lumière se traduisent par des *différences d'opacité* sur la plaque photographique ; on peut donc dire schématiquement que plus un élément est abondant, plus ses raies seront noires sur la plaque.

Mais l'*intensité d'émission* d'une raie est sous la dépendance de plusieurs facteurs, tels que les caractéristiques électriques de l'appareillage : voltage, intensité, capacité, fréquence, et surtout self-induction. La présence d'éléments étrangers et la tension de vapeur de ces éléments, ainsi que les variations de température modifient aussi l'intensité d'émission.

En second lieu, il s'en faut de beaucoup que le *noircissement photographique* soit une mesure de l'intensité d'émission. Ici également toute une série de facteurs entrent en jeu : la sensibilité de la plaque et sa courbe de noircissement ; le temps de pose et le mode de développement, et enfin la luminosité du spectrographe en fonction de la longueur d'onde. La présence des bandes, qui augmentent le noircissement du fond, ajoute encore une cause d'erreur aux précédentes.

Tels sont les facteurs qui modifient le noircissement de raies spectrales sur les clichés ; voyons à présent s'il est possible malgré ces perturbations d'établir, sur les variations du noircissement, les bases d'une analyse quantitative.

Procédés photométriques.

Utilité de la photométrie.

On peut, par l'examen d'un cliché, à l'œil nu ou à la loupe, se faire une idée de l'opacité d'une raie sur la plaque. Les chiffres donnés dans les tables de longueurs d'onde, correspondent ainsi à des données visuelles. Mais ces données subjectives restent très approximatives, principalement à cause du faible pouvoir séparateur de l'œil. C'est ainsi qu'une raie très étroite et très noire dans la réalité, paraîtra moins opaque à l'œil que l'ensemble de deux raies très voisines l'une de l'autre, mais beaucoup moins foncées. Ces erreurs sont encore augmentées par le facteur éclairage et par le noircissement plus ou moins prononcé de tout le spectre en général.

Il faut donc substituer à l'œil un enregistrement objectif au moyen d'un photomètre. Cet instrument se compose, en gros, d'un système analyseur et d'un système enregistreur. L'analyse du cliché se fait par une étroite fente éclairée qui s'avance sur le spectre ; chaque raie porte ombre sur une cellule photoélectrique. Les variations d'opacité s'inscrivent par l'intermédiaire d'un « spot » lumineux, qui trace un diagramme correspondant au cliché. (Voir sur la figure 11 le schéma d'un tel diagramme).

La photométrie est devenue en spectranalyse un procédé d'investigation générale dont on ne peut plus se passer : elle est en somme le complément de l'observation oculaire. En spectrographie quantitative, elle sert à « raffiner » les données de toutes les méthodes que nous allons exposer. Mais sur la lecture directe des photogrammes, on a essayé aussi d'établir une méthode d'analyse quantitative.

L'analyse quantitative par la photométrie.

Ces essais ont été faits par toute une série de chercheurs, en particulier *Jolibois* et *Bossuet*, *P. Urbain*, *Bouchetal de la Roche*, etc... Ce dernier auteur fait jaillir une étincelle dans des mélanges successifs et connus de CO^2 dans l'air. Il cherche alors, parmi les raies caractéristiques du carbone, celles qui varient régulièrement avec le pourcentage de cet élément, et photomètre les raies choisies dans chaque spectre.

Soit d'abord à évaluer la densité absolue de la raie ; elle est représentée sur le diagramme par la hauteur de la pointe, mesurée à partir d'une ligne dite « *d'opacité totale* ». Le logarithme de cette hauteur mesure à peu près la densité de la raie sur le spectre, et l'on constate que ces logarithmes sont proportionnels aux taux du carbone. Toutefois, la densité des raies semble devenir uniforme lorsqu'on atteint des concentrations un peu fortes ; elle augmente d'abord au centre, puis atteint une limite, et le noircissement gagne vers les bords, produisant ainsi une sorte d'élargissement. L'appréciation de la densité absolue de chaque raie donne donc

de mauvais résultats. D'autre part, le spot du photomètre, en décrivant la pointe d'une raie, délimite une surface, qui représente la *quantité d'énergie* lumineuse utilisée dans la raie. On peut essayer d'apprécier cette quantité en découpant le profil photométrique de cette surface dans chaque spectre, et en comparant par pesée les fragments de papier obtenus. Mais le périmètre de chaque raie est souvent difficile à délimiter, et la méthode est d'application difficile.

Mais si, au lieu de mesurer la densité de la raie par rapport à la ligne d'opacité totale, on la mesure par rapport à l'opacité *des régions immédiatement voisines*, on voit que cette nouvelle quantité obtenue ou plus exactement son logarithme, reste toujours proportionnelle aux concentrations successives de CO^2 .

En construisant des courbes et en se référant à des étalons établis à l'avance, on posséderait ainsi un procédé commode d'analyse quantitative.

Critique de cette méthode.

Mais un tel procédé n'est applicable que dans des cas très restreints. Dans les recherches de Bouchetal de la Roche, il s'agit d'un gaz enfermé dans une enceinte close, où l'on peut faire jaillir des étincelles toujours semblables à elles-mêmes. Or, même dans ce cas, une impureté, par exemple la vapeur d'eau, vient fausser tous les résultats. De tels examens sont également possibles dans les spectres de flamme de substances dissoutes, en milieu fortement alcalin, et ils ont été essayés dans des alliages de métaux. Partout ailleurs, ils ont toujours échoué.

Or, même dans les cas les plus favorables, des perturbations sont inévitables. Nous avons vu que l'intensité réelle d'émission d'une raie dépend de facteurs expérimentaux divers : régime et stabilité de l'étincelle, présence d'impuretés, de vapeur d'eau, etc... C'est assez dire que les procédés d'analyse quantitative par la voie uniquement photométrique sont impossibles en biologie; car on ne peut obtenir dans l'étincelage d'une coupe des conditions de destruction rigoureusement identiques, et trop de facteurs entrent en jeu qui modifient l'intensité des raies.

A supposer même qu'on puisse se rendre maître de ces facteurs, il faut compter avec des perturbations d'ordre photographique presque impossibles à éviter. Pour qu'une plaque enregistre correctement des valeurs lumineuses, il faut que les noircissements soient proportionnels à ces valeurs. Or, ceci n'est obtenu pour chaque plaque qu'entre deux limites assez restreintes de luminosité, dans la partie rectiligne de la « caractéristique de la plaque ». En dessous de la limite inférieure, on entre dans la zone de sous-exposition, où les mesures deviennent rapidement impraticables. En outre, il est à peu près impossible d'obtenir des plaques régulières sur toute leur étendue, et si l'on désire des mesures vraiment précises, on doit n'utiliser qu'une toute petite partie de cette surface. Si l'on ajoute enfin les causes d'erreur provenant du développement et du séchage des clichés, on arrive, pour des concentrations très faibles, à une erreur totale de 25 %, auxquels il faut ajouter les quelque 5 % provenant des photomètres.

La mesure photométrique de quantités d'éléments est

donc toujours une opération hasardeuse ; elle est possible, quoique délicate, dans un petit nombre de cas favorables. Elle est impossible dans les recherches histochimiques. A cette méthode de mensuration de chaque raie prise en particulier, il faut en substituer d'autres, où les mensurations se feront par rapport à des quantités aussi fixes que possible, c'est-à-dire à des raies invariables, prises comme terme de comparaison. Ceci devait être établi en détails.

La méthode des spectres comparés.

La méthode des spectres comparés est la plus simple et la plus sûre de toutes ; elle a été établie par *de Gramont* pour servir de complément aux données approximatives fournies par la disparition successive des raies dans le spectre. Elle se libère à peu près entièrement des sources d'erreurs énumérées ci-dessus.

Le principe de cette méthode est le suivant. On établit une série d'étalons dans lesquels une substance dite « *fondamentale* » reste fixe ; à cette substance on ajoute chaque fois une quantité croissante d'une autre substance dite « *additionnelle* », de manière à obtenir des mélanges titrés en proportions connues. Il s'agit de doser, dans un échantillon proposé, une substance analogue à cette substance additionnelle. On prend des spectres successifs de l'échantillon, mais on intercale entre chacun un spectre de l'étalon, correspondant à un titre

donné. Sur le spectrogramme obtenu, on compare alors les raies de l'élément en cause dans l'échantillon, avec les raies identiques dont le titre est connu. Lorsque leur intensité est pareille, on en conclut qu'il y a égalité de concentration dans les deux spectres.

L'application de cette méthode fort simple exige que les circonstances d'apparition des raies soient toujours identiques à elles-mêmes, pendant tout le temps que durent les recherches. On contrôle aisément que cette condition est remplie en examinant les raies de la substance fondamentale : ces raies doivent, dans tous les spectres, présenter des opacités rigoureusement pareilles. Toutes choses étant égales, les résultats obtenus sont d'une remarquable exactitude, et l'erreur est à peine de 5 %. Dans la pratique, le problème est un peu plus difficile à résoudre parce que l'intensité des raies de l'échantillon est le plus souvent comprise entre deux des valeurs étalonnées ; on peut alors construire une courbe et faire une interpolation ; mais les résultats seront moins précis. Pour augmenter cette précision, on tâchera qu'entre les titres des étalons les étapes soient aussi petites que possible ; l'exactitude sera d'autant plus grande que ces étapes seront plus petites.

Un principe tout à fait identique a été appliqué par *P. Urbain* au dosage de très faibles quantités d'or ; la substance fondamentale est alors une quantité constante d'argent, que l'on dépose, par électrolyse, en même temps que l'or, sur une électrode en charbon. Le spectrogramme obtenu présente donc les raies ultimes de l'or et les raies principales de l'argent ; les noircissements de ces raies sont photométrés ; on obtient ainsi

plusieurs doublets constitués chacun par une raie Au et une raie Ag, convenablement choisies. On étudie les rapports de noircissement entre les raies de ces doublets : ces rapports caractérisent la quantité d'or introduite, puisque la quantité d'argent est toujours la même.

La méthode des spectres de comparaison ainsi posée a été appliquée presque sans modification aux recherches biologiques par *H. Ramage* et *J. H. Sheldon*. Ces auteurs, ainsi que nous l'avons vu, dessèchent des fragments de tissus, les broient dans un mortier d'agate et enferment 5 ctg. de cette poudre dans un petit rouleau de papier filtre sans cendre, pesant 0,12 gr. Ce rouleau est ensuite brûlé dans la flamme d'un chalumeau, et il s'agit alors de doser les éléments minéraux contenus dans la poudre.

Certaines solutions standard sont préparées pour des groupes de métaux recherchés, par exemple les deux suivants :

1°) Na, 0.15 ; K, 0.20 ; Ca, 0.02 ; Li, 0.0004 ; Rb, 0.004 ; Mg et Fe, 0.05 ; Cu et Co, 0.005 ; Mn et Ni, 0.002 ; Cd, 0.10 ; P, 0.50.

2°) Sr, 0.002 ; Ag, 0.0025 ; Pb, 0.05.

Des fragments égaux de papier filtre sont ensuite imbibés avec des quantités croissantes de ces solutions standard, 0,02 — 0,05 — 0,1 et 0,2 cc... etc... On obtient ainsi toute une série de papiers étalonnés, contenant chacun une quantité connue de chaque métal. Des surfaces égales de ces divers étalons sont brûlées dans la flamme, et l'on reçoit sur la plaque quatre ou cinq

spectres de comparaison, où l'intensité des raies va en croissant.

Sur la même plaque, on enregistre les spectres de l'échantillon que l'on compare aux spectres de référence ; par comparaison, on situe le métal à doser dans l'échelle des étalons et l'on obtient la quantité cherchée. Si, par hasard, la comparaison est impossible, on change le titre des papiers, ou bien on utilise une quantité plus forte ou plus faible de l'échantillon à étudier. Cette méthode suppose naturellement que les conditions de destruction du matériel restent exactement les mêmes pendant toute la durée des examens, ce qui est possible dans la méthode de Ramage ; mais l'étincelle de haute fréquence est loin d'être aussi régulière que la flamme du chalumeau, et la destruction d'une coupe avec le souci de la localisation, ne peut être comparée à celle d'une poudre inerte, brûlée dans un rouleau de papier filtre.

Personnellement, nous avons établi pour *la recherche quantitative de l'or sur les coupes*, toute une série d'étalons ainsi composés : on découpe dans du *papier filtre sans cendre* (filtre Durieux, Paris, n° 111), au moyen d'un gabarit, des surfaces régulières, de 10 cm² de superficie. Ces fragments sont imbibés d'une quantité juste nécessaire (1/10 de cc.) de solutions successives titrées de chlorure d'or, et mis à sécher, avec précaution, sur des lamelles placées de champ. Les dilutions sont calculées de manière à obtenir des papiers étalonnés à des taux croissants de chlorure ; et ces taux sont rapportés en poids d'or au mm². L'on a ainsi des papiers à 1 γ , 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 et 1/100 de γ . On détruit

ensuite ce papier par l'étincelle sur une surface aussi proche que possible d'un mm^2 ; et l'on obtient des spectres où la substance variable est l'or, et où la substance fondamentale est représentée par les raies du carbone contenu dans le papier.

A l'usage, ce procédé a paru peu pratique. Les causes d'erreurs sont nombreuses, et de multiples examens sont nécessaires pour obtenir des données moyennes, ou comparables entre elles. Il est presque impossible d'avoir des spectres égaux, même à l'œil nu, tant les conditions de l'examen sont variables. Cependant, malgré ces imperfections, on a pu déterminer d'une façon approximative la teneur en or de divers organes ; cette teneur variait entre $1/5$ et $1/10$ de γ par mg. de substance sèche ; ces chiffres correspondent à ceux des auteurs étrangers.

De tels résultats, obtenus dans des conditions si défectueuses, sont tout à l'avantage de la méthode des spectres comparés. Elle a pour principal mérite de libérer l'analyse des facteurs essentiels de variabilité, et ceci parce que tous les spectres sont enregistrés sur une même plaque dans des conditions comparables. Les variations photographiques ne sont plus alors que de 5 % environ, parce que les raies comparées sont très proches l'une de l'autre. Et lorsqu'une erreur est inévitable, la présence des raies fixes permet au moins qu'on s'en aperçoive et qu'on l'évalue.

Méthode des « paires de raies homologues ».

Le vrai point faible de la méthode des spectres comparés est la longue durée de son exécution ; il faut d'abord préparer avec soin toute une série d'étalons titrés, prendre ensuite plusieurs spectres de ceux-ci et de l'échantillon analysé ; en pratique, chaque examen doit même être répété plusieurs fois. Si bien que l'on n'est pas du tout à l'abri des variations qui se produisent au sein même de l'étincelle. Pour ces raisons, un certain nombre de travailleurs ont cherché à mettre au point des méthodes exemptes de telles causes d'erreurs. La caractéristique de ces nouvelles méthodes est qu'elles s'appuient non sur des comparaisons d'intensité entre deux ou plusieurs spectres, mais sur les relations qui existent, dans un même spectre, entre les raies de deux éléments en proportions variables.

Sur ce principe, *Gerlach* et *Schweitzer* ont établi un procédé qu'ils ont appelé « *méthode absolue des paires de raies homologues* ». Cette méthode a le gros avantage de ne pas exiger la préparation laborieuse de toute une série d'étalons titrés ; un seul enregistrement spectral peut suffire, et si l'on en fait plusieurs, c'est plutôt par mesure de sécurité et pour obtenir un résultat plus précis. Voici les grandes lignes de ce procédé :

Lorsqu'on étudie les spectres d'un mélange de deux substances, une substance fondamentale F et une subs-

tance additionnelle A, on s'aperçoit que pour certaines concentrations de l'une dans l'autre, il y a égale intensité entre certaines lignes de F et certaines lignes de A. L'on arrive ainsi à grouper ces lignes deux à deux, par « paires » d'égale intensité. Après des examens multi-

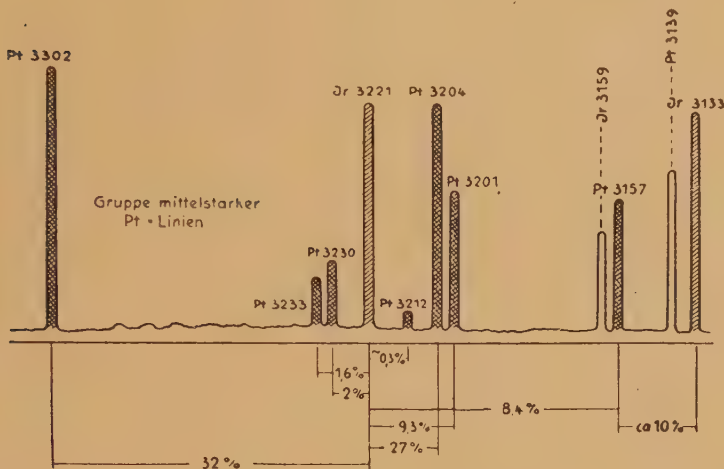


FIG. 11 : Schéma des « points fixes »
d'un alliage Platine-Iridium.
Figure prise dans Geilach (1933).

ples, on peut conclure que les lignes F_1 et A_1 sont égales lorsque l'élément A est contenu dans une proportion de x_1 % dans l'élément F. Pareillement, on aura égalité entre les lignes F_2 et A_2 pour un taux de A dans F égal à x_2 %... etc... Les raies que l'on peut ainsi grouper deux à deux sont très nombreuses, mais il faut encore que cette égalité, qui les lie, résiste aux variations contingentes, ce qui est assez rare. Deux raies satisfaisant à cette condition sont dites « homologues » ;

la concentration relative des deux substances, qui détermine l'égalité de deux de leurs raies, s'appelle leur « *point fixe* ».

Par des examens très nombreux et très attentifs, Gerlach et Schweitzer ont établi toute une série de tables où l'on trouve précisément ces points fixes en fonction des deux longueurs d'onde de la substance fondamentale et de la substance additionnelle. A titre d'exemple, la figure 11 représente les points fixes des paires homologues de l'Iridium dans le Platine. On dira donc que l'intensité des lignes Ir : 3220,8 et Pt : 3301,9 est égale lorsque le taux de Ir dans Pt est égal à 32,8 %. Le point fixe des raies Ir : 3220,8 et Pt 3204,1 est 26,8 % d'Ir dans Pt. (C'est le cas représenté par la figure).

Pour que la méthode puisse porter ses fruits, il faut que la nature physique de l'énergie qui crée les raies soit toujours égale à elle-même. Ou, si l'on veut, que les deux raies de la paire appartiennent toutes deux à des ions, ou toutes deux à des atomes neutres, par exemple. Le critérium de cette constance a été trouvé dans le spectre lui-même : c'est l'égale opacité de deux raies de la substance fondamentale choisies pour être particulièrement affectées par les contingences expérimentales. Ce seront de préférence une raie d'arc et une raie d'étincelle du même élément, situées au voisinage l'une de l'autre.

La sécurité de cette méthode des raies homologues est vraiment « absolue » en ce sens qu'elle est indépendante de tous les facteurs de variation qu'affectaient les autres procédés. Lorsqu'on aura trouvé une « vraie

paire de raies homologues », l'égalité de leurs valeurs subsistera quelles que soient les modifications du régime de l'étincelle (sa fréquence, son intensité, son voltage et son amortissement). La présence d'éléments étrangers, d'autres sels minéraux, est sans influence ; la question des tensions de vapeur ne joue plus ; et pour les deux éléments considérés, la nature de l'anion qui supporte chacun des métaux, est également sans importance. La présence des bandes qui noircissent le fond ne peut affecter le rapport d'égalité entre les deux lignes. Enfin, les erreurs photographiques deviennent pratiquement négligeables : on opère sur un seul point de la plaque ; les deux noircissements à comparer sont toujours de la même valeur, ou presque, et se trouvent également placés sur la « caractéristique » de la plaque, et, éventuellement, du photomètre.

Wa. et We. Gerlach ont adapté cette méthode aux recherches histospectrographiques. Soit par exemple pour doser l'or dans des préparations. Des fragments pesant de 0,2 à 1 gr. d'organes fixés ou non au formol, sont déshydratés à l'alcool de manière à ce qu'ils absorbent également les solutions. Les fragments sont ensuite portés sur une platine chauffante jusqu'à l'évaporation de l'alcool ; ils deviennent bientôt « semblables à de l'éponge ». On prend alors la « *substance auxiliaire* » qui servira de base à l'analyse quantitative. Dans ce cas, il s'agit d'une solution déci-normale de *nitrate de plomb*, dont on dépose 1/10 de cc. avec une micropipette sur l'organe. Il est essentiel que chaque morceau soit détruit jusqu'à la dernière parcelle, afin que pas une trace d'or ne puisse échapper ; cette destruc-

tion demande au plus 5 minutes. Lorsque les quantités d'or sont trop fortes, on réduit la largeur de la fente afin que l'opacité des raies ne soit pas excessive. L'appréciation des raies est faite ensuite, à l'œil nu ; l'emploi d'un photomètre est un luxe inutile.

Ainsi fixée, la méthode des « paires de raies homologues » est particulièrement séduisante, par l'exactitude des résultats qu'elle fournit. La précision est considérable : on arrive ainsi parfois à distinguer des taux qui diffèrent entre eux de 0,2 0/00. Lorsque tout est bien réglé, l'erreur sur le résultat n'est plus que de 5 %.

Méthode du secteur logarithmique.

La méthode du secteur rotatif de Scheibe-Neuhäusser est encore un perfectionnement de la précédente. Un des inconvénients de cette dernière est que l'appréciation des taux de concentration se fait en quelque sorte par étapes successives, entre lesquelles une interpolation est nécessaire. La méthode présente remédie à cet inconvénient.

L'appareillage est caractérisé par un secteur rotatif, dont le profil « logarithmique » est représenté schématiquement ci-contre. L'image de la source lumineuse est reçue par un système de deux lentilles convergentes, de telle sorte que son image se forme exactement dans le plan même de la lentille collimatrice. Devant la fente

du spectrographe, on place le secteur rotatif, entraîné par un moteur convenable. Le secteur est placé entre les deux lentilles convergentes, et les rayons lumineux qui le traversent sont parallèles.

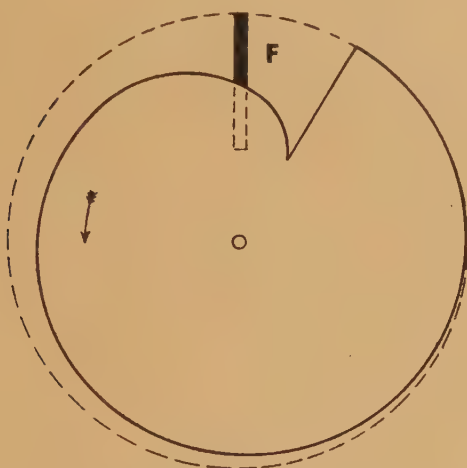


FIG. 12 : Schéma du secteur logarithmique
(d'après Gerlach).
F : fente du spectroscopie.

Les spectres enregistrés de cette manière ont un aspect très particulier. La partie inférieure de chaque spectre présente des raies très intenses, parce qu'elle a reçu la lumière pendant toute la rotation du secteur.

Au-dessus, les raies vont en s'affaiblissant, car elles correspondent à des temps d'exposition de plus en plus courts. Plus une raie est émise intensément, plus elle est longue sur le spectre, et cette longueur est proportionnelle au logarithme de l'intensité.

Ce moyen de mensuration a quelque analogie avec les méthodes de la spectrographie d'absorption. Dans le cas présent, on l'applique aux paires de raies homologues de Gerlach-Schweitzer : on mesure simplement les divers « points fixes » de deux substances, et on calcule les différences de hauteurs des raies ainsi obtenues. On construit une courbe au moyen de laquelle des analyses ultérieures deviennent possibles.

Il est à peine besoin de dire que cette méthode est absolument inapplicable à la spectrographie histologique ; en effet, elle suppose que la destruction de la substance, et la rotation du secteur, se font dans des temps déterminés, rigoureusement égaux, afin que les longueurs de raies de la substance fondamentale demeurent égales entre elles. Cette condition est impossible à remplir en biologie.

D'autre part, cette méthode est un perfectionnement mais aussi une complication de la précédente ; or, celle-ci est déjà très compliquée par elle-même, et c'est le principal reproche qu'on puisse lui faire. Elle est praticable seulement dans les laboratoires bien outillés, et entre des mains expérimentées.

Or, nous ne devons pas oublier qu'il s'agit ici de recherches histochimiques ; et l'on peut se demander si, dans le domaine biologique, la simplicité doit toujours céder le pas à la précision. Parmi toutes ces méthodes, la plus simple est sans conteste celle des spectres de comparaison. Si elle ne permet pas d'obtenir des résultats d'une précision parfaite, elle fournit des données numériques approximatives, la plupart du temps suffisantes. En biologie, les chiffres trop

exacts n'établissent souvent qu'une sécurité trompeuse ; alors que des résultats numériques approchés permettent des généralisations beaucoup plus sûres. Ce qui est surtout intéressant, ce sont les relations qui existent entre les données numériques, relations qui peuvent se traduire par les signes : $= > <$ ou bien encore : zéro. $+$, $++$, $+++$. La méthode des spectres de comparaison permet d'obtenir de semblables données ; c'est son principal avantage.

6

Possibilités de l'histospectrographie.

A l'issue de ce travail, il est inutile d'insister encore une fois sur les avantages que présente l'application de la spectrographie à la chimie histologique ; ces avantages se devinent d'eux-mêmes. Mais l'histospectrographie est une méthode jeune, qui évolue chaque jour ; il n'est donc pas sans intérêt de savoir où elle en est de son évolution, de faire le point, en quelque sorte

Un élément essentiel à déterminer à ce point de vue est le seuil de sensibilité de la méthode. Ce seuil est excessivement bas : les physiciens admettent que pour déterminer l'apparition d'une raie ultime, 1/10 et même 1/100 de microgramme de substance peuvent suffire. Certains métaux, comme le Platine, l'Argent, le Cuivre, sont décelés à l'état de traces pour ainsi dire impondérables. Comme le dit Urbain, cette extrême sensibilité de l'analyse spectrale est devenue « légendaire ».

Mais bien que ces quantités soient extraordinaire-
ment faibles, elles ne sortent pas du domaine de la
biologie courante, car, en histospectrographie, on
apprendra à compter par « gammas ».

Dans la pratique, les progrès de cette méthode sont
limités tout à la fois par le seuil de sensibilité de la
spectranalyse et par les conditions mêmes dans les-
quelles cette analyse est conduite. Un facteur essentiel
est la quantité de tissu que l'on peut étudier. Dans les
conditions actuelles de la technique, la destruction par
l'étincelle s'opère sur un espace circulaire ayant au
minimum $\frac{1}{2}$ mm. de diamètre, et le plus souvent un
millimètre. Les coupes ont en général $\frac{1}{2}$ mm. d'épais-
seur ; le volume du tissu détruit est donc de $\frac{1}{2}$ mm³, qui
pèse, en gros, $\frac{1}{2}$ milligramme. Pour fixer les idées, disons
qu'en substance sèche, le poids de la matière détruite
est de l'ordre de 1/10 de milligramme, où l'on peut
détecter les éléments chimiques avec une certitude abso-
lue, qui s'affirme à chaque raie de l'élément rencontrée
dans le spectre.

Peut-on aller plus loin ? Peut-on espérer qu'un jour
on appliquera cette méthode à des éléments histologiques
isolés, une cellule, une fibre par exemple ? Un premier
point à obtenir serait de localiser la destruction sur un
territoire extrêmement réduit, de l'ordre de grandeur
d'une cellule. Il faudrait, pour réaliser cette condition,
obtenir des micro-étincelles suffisamment petites, et
surtout suffisamment fixes, ce qui est impossible avec
les appareils actuels. Lors même que cette difficulté
serait surmontée, on se trouverait encore en face d'une
autre difficulté, bien plus insurmontable : La destruc-

tion d'une zone aussi réduite se ferait avec une rapidité considérable, qu'il est impossible d'évaluer actuellement. Même en travaillant avec une très large fente, aucune plaque photographique connue jusqu'à présent ne serait assez sensible pour enregistrer d'aussi faibles quantités de lumière.

Peut-être ces difficultés seront-elles un jour vaincues par les physiciens : le problème se ramène à des questions de technique sans cesse remaniée, et en perpétuelle évolution. Mais dans l'état actuel de la question, et avec les techniques dont nous disposons, il faut avouer que l'on ne peut encore scientifiquement prévoir comment sera réalisée cette « cyto-spectrographie », future.

CONCLUSIONS

1° *L'histospectrographie* est un procédé d'analyse histochimique consistant à faire jaillir une étincelle électrique de haute fréquence sur un point préalablement repéré d'une coupe, à détruire ce point, et à prendre le spectre d'émission (spectre de raies) de l'étincelle. Cette technique se décompose ainsi :

2° La coupe, supportée par une électrode inférieure, est mise sur un statif microscopique spécial. L'étincelle de haute fréquence, produite par un appareil convenable, jaillit sur le point repéré microscopiquement, par l'intermédiaire d'une électrode supérieure, choisie au préalable.

Son image est concentrée sur la fente d'un spectrographe en quartz, et un spectrogramme est enregistré.

3° Cette méthode est extrêmement sensible, et, par là même, expose à des erreurs, provenant principalement des souillures. Mais elle est *chimiquement très sûre* ; elle permet une *localisation exacte* du point à analyser.

4° Les spectrogrammes examinés avec un comparateur optique, montrent les raies des électrodes, et celles des éléments de la coupe. L'examen porte habituellement dans la région ultra-violette du spectre, et, plus spécialement, sur les « *raies de grande sensibilité* » ou sur les « *raies ultimes* » des éléments.

5° La méthode, actuellement *qualitative* seulement, peut être orientée dans le sens *quantitatif*. Les procédés *photométriques* ne donnent des résultats que dans des cas bien spéciaux. — La méthode du *secteur logarithmique* n'est pas facilement applicable aux recherches biologiques. — La méthode des « *paires de raies homologues* » de W. Gerlach, semble donner des résultats rigoureux ; mais elle est d'une technique délicate. — La méthode des *spectres comparés*, donne une orientation quantitative souvent suffisante en biologie.

Vu :

Le Doyen,
J. LÉPINE.

Le Président de la Thèse,
A. POLICARD.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 6 décembre 1933.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE.

BIBLIOGRAPHIE

ANSTETT, P. — Comparaison entre les méthodes de détection de l'or dans les tissus au cours de la chrysothérapie. *Thèse de Lyon*, 1933.

BARDET, J. — Atlas des spectres d'arc. Doin, éditeur, Paris, 1926.

BAYLE, E., FABRE, R. et GEORGE, H. — Quelques applications de l'analyse spectrographique en chimie biologique. *Bull. Soc. Chimie biologique*; 7; 1168; 1925.

BENOIT, W. — Ueber spektrographische Untersuchungen an Gewebsschnitten menschlicher organe unter Verwendung des Hochfrequenzfunkens nach Gerlach-Schweitzer. *Zeit. f. d. ges. exp. Med.*; 90; 3/4 h.; 1933.

BOUCHETAL DE LA ROCHE. — Sur le dosage de quelques gaz au moyen du spectrographe. *Bull. Soc. Chim.*; 47; 1326; 1930.

— Méthode de dosage de mélanges d'acide carbonique et d'air au moyen du spectrographe. *Bull. Soc. Chim.*; 47; 660; 1930.

- CISSARZ, A. — Die durchschnittliche Zusammensetzung des Mansfelder Kupferschiefers. *Metall. u. Erz.*; 12; 1930.
- DUTOIT, P. et ZBINDEN, C. — Analyse spectrographique des cendres d'organes. *C. R. Acad. Sciences*; 190; 172; 1930.
- FERGUSON. — Le spectre du chlorure d'or. *Nature*; 120; 298; 1927.
- FOX, H. M. et RAMAGE, H. — Spectrographic analysis of animal tissues. *Proc. Roy. Soc. London*; 108; 1931.
- Spectrographic analysis of tissues. *Nature*; 126; 683; 1930.
- GERLACH, Wa. — Uebersicht über die Aufgaben der Spektralanalyse. *Naturwiss.*; 19; 25; 1931.
- GERLACH, Wa. et SCHWEITZER, E. — Die chemische emissions spektralanalyse. I. *Verl. L. Voss, Leipzig*; 1930.
- GERLACH, Wa. et We. — Der Elementnachweis im Gewebe. I. Der exakte Bleinachweis im Gewebe. *Arch. f. Gewerbepath.*; 2; 7; 1931.
- Der Elementnachweis im Gewebe. II. Der Gold- und Silbernachweis im Gewebe. *Virch. Arch.*; 282; 208; 1931.
- Der Elem. nachweis im Gewebe. III Zur Frage der Argyrosen, insbesondere über den spektrographischen Silbernachweis in der Haut. *Dermat. Woch.*; 95; 1497; 1932.
- Der Elementnachweis im Gewebe. V. Der Thoriumnachweis im Gewebe. *Virch. Arch.*; 287; 135; 1932.

- Die chemische Emissions-spektralanalyse. II. *Verl. Voss.* ; Leipzig ; 1933.
- Bleinachweis im organischen Gewebe. *Naturwiss.* ; 19 ; 111 ; 1931.
- GERLACH, Wa. et RUTHARDT, K. — Neue Untersuchung über Anregung (Hochfrequenz, Flammenbogen) und allgemeine und spezielle Vorschriften für die qualitative Analyse von Metallen. *Z. anorg. u. allg. Chem.* ; 209 ; 337 ; 1932.
- GERLACH, Wa. et SCHWEITZER, E. — Foundations and methods of chemical analysis by the emission spectrum. Hilger, édit. Londres, 1930.
- Grundlegende Arbeit über die Hochfrequenzmethode. *Z. anorg. u. allg. Chem.* ; 195 ; 255 ; 1931.
- Die Verwendung von Hochfrequenzerzeugung ; der quantitative Nachweis kleinster Quecksilbermengen. *Zeitschr. anorg. Chemie* ; 195 ; 255 ; 1931.
- GERLACH, We. — Die Deutung des Aschengebildes in der Pathologie. *Verh. deutsch. pathol. Gesellsch.* ; 26 ; 163 ; 1931.
- Die Staublungge des Mansfelder Bergmanns, zugleich ein Beitrag zur Frage Staublungge und Lungentuberkulose. *Arch. f. Gewerbepath.* ; 2 ; 1931.
- GERLACH, We. et GANDER, G. — Ueber akute Staublunggen, zugleich ein Beitrag zur Frage Staublungge und Lungentuberkulose. *Arch. f. Gewerbepath.* ; 3 ; 1932.
- GERLACH, We. et RUTHARDT, K. — Der Elementnachweis im Gewebe. Der quantitative Kupfernachweis. *Ziegler Beitr.* ; 1933.

- Der Elementnachweis im Gewebe. VI. Grundsätzliches über die Anwendung der Emissionsspektrographie zur Elementdiagnose. *J. f. d. ges. gerichtl. Med.*; 20; 1932.
- GERLACH, We., RUTHARDT, K. et PRÜSENER, L. — Der Elementnachweis im Gewebe. VII. Der quantitative Goldnachweis. *Zieglers Beitr.*; 1933
- Der Elem. Nachweis im Gewebe. (Die quantitative Bestimmung von Gold). *Beit. Z. path. Anat.*; 91; 617; 1933.
- JOLIBOIS, P. et BOSSUET, R. — Recherches des traces d'or par spectrographie. *Bull. Soc. chim.*; 38; 1297; 1925.
- KAHLENBERG, L. et CLOSS, J. Ö. — On the presence of aluminium in plant and animal matter. *J. biol. chem.*; 83; 261; 1929.
- KAYSER, H. — Tabelle de Hauptlinien des Linienspektra aller Elemente. Berlin, Springer, édit., 1926.
- KLOSTERMANN, M. — Ueber den Nachweis kleinster Bleimengen in Organen auf chemischen und spektrographischen Wege. *Naturwiss.*; 14; 1926.
- KOCKEL, H. — Histochemische Metallnachweise. *Virch. Arch.*; 277; 1930.
- LAET, M. de. — La spectrographie en médecine légale *Ann. Méd. légale crim. et police scientifique*; 1922, p. 137.
- LECOQ DE BOISBAUDRAN et A. DE GRAMONT. — Analyse spectrale appliquée aux recherches de chimie minérale. Hermann, édit., Paris, 1923.
- LÖWE, F. — Atlas der letzten Linien. Leipzig, 1928.

LUMIÈRE, A. et SEYEWETZ, A. — Nouvelle contribution au développement d'images à grains fins. *Rev française de Photographie* ; 13 ; 65 ; 1932.

LUNDEGARDH, H. — Die quantitative Spektralanalyse der Elemente. Verlag G. Fischer ; Iéna ; 1929.

MAC COLLUM, E. V., RASK, O. S. et BECKER, J. E. — Do spectrograms of Kahlenberg and Closs demonstrate presence of aluminium in biological matter. *J. Biol. Chem.* ; 85 ; 779 ; 1930.

MOREL, A. et POLICARD, A. — Technique spectrographique de microanalyse. Application à la détection histologique de certains éléments. *Bull. Soc. chim. de France* ; 51 ; 1125 ; 1932.

MOREL, A., POLICARD, A. et RAVAUULT, P. P. — Application de la spectrographie à l'étude histochemique de l'aorte normale et pathologique de l'homme. *Bull. d'Hist. appliquée* ; 9 ; 22 ; 1932.

MOURIQUAND, G., LEULIER et NOGIER. — Recherches sur la fixation du strontium dans le rachitisme expérimental. *C. R. Soc. Biol.* ; 106 ; 18 ; 1931.

NEGRESKO, R. — Sur les raies ultimes des spectres d'éclincelle condensée. *Bull. Math. et Phys.* ; Bucarest ; 93 ; 1931.

OKAJIMA, S. — Spectral analysis of metals, especially heavy metals in every parts of the organs of Japanese. I. *Acta scholae med. univ. imp. in Kioto* ; 13 ; 417 ; 1931.

— Spectroanalysis of metals, especially heavy metals in the pathological human tissues. *Acta scholae med. univ. imp. in Kioto* ; 14 ; 88 ; 1931.

- Spectrographic study on some heavy metals administered per os and parenterally. *Acta scholae med. univ. in Kioto* ; 14 ; 93 ; 1931.
- ORENT, E. R. et MC COLLUM, E. V. — Méthode d'analyse spectrale pour la détection du Manganèse dans les aliments. *J. Biol. Chem.* ; 92 ; 1931.
- PACINI, A. J. — Ultra-violet spectrographic detection of mercury. *Am. J. Police Sc.* ; 1 ; 387 ; 1930.
- POLICARD, A. — Considérations sur l'histochemie. *Bull. Ass. des Anat.* ; 1933.
 - Détection histospectrographique du cuivre renfermé dans le foie normal et pathologique. *Bull. d'Histologie* ; 10 ; 94 ; 1933.
 - Etude, par la méthode histospectrographique, du cuivre renfermé dans le foie normal et pathologique. *C. R. Soc. Biol.* ; 113 ; 1933.
 - L'histospectrographie. *Protoplasma* ; 19 ; 602 ; 1933.
 - Some new methods in histochemistry. *The Harvey Lectures* ; 27 ; 1932.
- POLICARD, A., CORDIER, V., DUFOUT, A., ANSTETT, P. et PETEY, M. — Application de la méthode histospectrographique dans la détection de l'or au cours de la chrysothérapie. *Soc. Méd. des Hôp. de Lyon* ; séance du 14 mars 1933.
- POLICARD, A., DUFOUT, A., ANSTETT, P. et PETEY, M. — Application de la méthode histospectrographique à l'étude de la localisation de l'or dans l'organisme au cours de la chrysothérapie. *Bull. d'Hist. appl.* ; 10 ; 57 ; 1933.

POLICARD, A. et MARTIN, E. — Recherches d'histochimie quantitative sur la silico-tuberculose pulmonaire. *Bull. d'Hist. appl.* ; 10 ; 22 ; 1933.

POLICARD, A. et MOREL, A. — Application de la méthode histospectrographique à l'étude des pneumoconioses minérales. *Médecine du Travail* ; 4 ; 56 ; 1932.

— Application de la spectrographie d'émission aux recherches histochimiques. *C. R. Ass. des Anat.* ; 21 mars 1932.

— Application de la spectrographie d'émission aux problèmes histochimiques. L'histospectrographie par étincelage direct des coupes. *Bull. d'Hist. appl.* ; 9 ; 57 ; 1932.

— Influence de la qualité de l'étincelle sur les résultats obtenus en histospectrographie. *Bull. d'Hist. appl.* ; 9 ; 139 ; 1932.

— Techniques spectrographiques de microanalyse. Applications à la détection histologique de certains éléments. *Bull. Soc. Chim.* ; 51 ; 1125 ; 1932.

— Utilisation de la spectrographie des raies en histochimie (Histospectrographie). *C. R. Ac. des Sciences* ; séance du 1^{er} février 1932.

— Utilisation comparative d'une étincelle ou d'un arc dans la spectrographie des coupes. *C. R. Acad. Sciences* ; p. 1015, séance du 14 mars 1932.

POLICARD, A., MOREL, A. et RAVAUULT, P. P. — Etude histospectrographique de la localisation du calcium et du magnésium dans l'aorte humaine et de leurs variations au cours de l'athérome. *C. R. Acad. Sc.* ; 194 ; 201 ; 1932.

- PROBST, R. — Quantitative Bestimmung von Hg in Harn ; Bi. in Zahnfleischsaum. *Arch. exp. Path. u. Pharm.* ; 169 ; 119 ; 1933.
- RAMAGE, H. — Spectrographic chemical analysis. *Nature* ; 123 ; 601 ; 1929.
- RAMAGE, H. et SHELDON, J. H. — Mineral content of eyes. *Nature* 128 ; 376 ; 1931.
- SCHEIBE, G. et SCHNETTLER, O. — Photometrische Methoden. *Naturwiss.* ; 18 ; 753 ; 1930 — 19 ; 134 ; 1931.
- SCHWARZACHER, W. — Spektrographische Untersuchungen von Geschossen der Faustfeuerwaffen. *D. Z. f. d. ges. gerichtl. Med.* ; 13 ; 1929.
- SHELDON, J. H. et RAMAGE, H. — A spectrographic analysis of human tissues. *Biochem. J.* ; 25 ; 1608 ; 1931.
- SMITH, D. M. — Méthode des paires de raies homologues appliquée à l'analyse de Cd, Pb, Fe dans Zn et à d'autres analyses. *Transact. Faraday Soc.* ; 26 ; 1930.
- SPATH, W. — Grenzempfindlichkeit der Spektralanalyse. *Wien. Anz.* ; n° 16 ; 142 ; 1932.
- THOVERT, J. et J. F. — Sensibilisation des plaques photographiques à l'ultra-violet. *Bull. des Séances de la Soc. Fr. de Physique* n° 330 ; p. 158 ; 1932.
- THURNWALD, W. et HAUROWITZ, F. — Ueber die Schwermetalle der menschlichen Leber und ihren spektrographischen Nachweis. *Z. phys. Chem.* ; 181 ; 1929.

- TIMM, F. — Zellmikrochemie der Schwermetallgifte, Hab.-Schrift, Leipzig, 1932.
- TOURTELOTTE, de, et RASK, O. — Spectrographic determination of aluminium in biological ashes. *Industr. and engineering chemistry* ; 3 ; 1931.
- TWYMAN, F. — The practice of spectrum analysis with Hilger instruments. Hilger, éd. ; Londres ; 1931.
- TWYMAN, F. et HITCHEN, C. S. — Analyses quantitatives de métaux au moyen du spectre d'étincelle et d'un secteur rotatif. *Proc. Roy. Soc. Anat.* ; 133 ; 72 ; 1931.
- TWYMAN, F. et SIMEON, F. — Méthode du secteur rotatif. *Trans. opt. Soc.* ; 31 ; 169 ; 1929-30.
- TWYMAN, F. et SMITH, D. M. — Wavelength tables for spectrum analysis. Hilger, éd. ; London.
- URBAIN, G. — Introduction à l'étude de la spectrochimie. Hermann, édit. ; Paris, 1911.
- URBAIN, P. — Sur une méthode quantitative d'analyse spectrale. *Soc. Chim. de France* ; 47 ; 1183 ; 1930.
- WOOD, F. C. — Détection de petites quantités de plomb dans les coupes. *J. of Cancer Res.* ; 14 ; 1930.
- WRIGHT, T. A. — Herstellung reiner Goldelektroden. *Metals and Alloys* ; 3 ; 146 ; 1932.
- ZALKA, V. — *Verh. dtsh. path. Ges.* ; 1931.
- ZANGGER, H. — L'évolution des méthodes de spectroscopie, de spectrographie, et leurs applications en médecine légale. *Ann. méd. lég. crim. police* ; 1922, p. 145.

ZANGGER. — Ueber neue Beweisverfahren bei Vergiftungen. *Schweiz. Z. f. Unfallmed.*; 1930.

ZBINDEN. — *Mém. Soc. vaudoise Sciences Naturelles*; 3; 233; 1930.

ZBINDEN, Ch. — Recherches spectrographiques sur des cendres de sang et d'organes humains. *Thèse de Lausanne*; 1930.

Table des Matières

DÉFINITION	9
1° Histoire de la spectrographie d'émission appliquée à la biologie	13
Méthodes spectrographiques du type micro- chimique	14
Méthodes spectrographiques du type histo- chimique	18
2° Technique employée	23
Préparation et repérage de la coupe	24
Le dispositif d'étincelage	31
Les spectrographes ; prise d'un spectro- gramme	43
Les erreurs	57
3° Autres techniques analogues	65
Méthode de Wa. et We. Gerlach	65

Méthode de W. Benoit	70
Comparaison de ces méthodes avec celle de Policard-Morel	72
4° Etude des spectrogrammes. Données qualitatives..	77
Mode d'examen des spectrogrammes	77
Etude des raies	84
5° Données quantitatives	101
Fondements de ces méthodes	102
Procédés photométriques	105
Méthode des spectres comparés	109
Méthode des paires de raies homologues ..	114
Méthode du secteur logarithmique	118
6° Possibilités de l'histospectrographie	123
CONCLUSIONS	127
BIBLIOGRAPHIE	129

